

Der Aktinnukleator Cobl:
Lokalisationsstudie und funktionelle Analysen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Julia Grimm
geboren am 02.12.1987 in Schleiz

Gutachter:

1. Gutachter Prof. Dr. Britta Qualmann, Jena
2. Gutachter Prof. Dr. Christian A. Hübner, Jena
3. Gutachter PD Dr. Christoph Kaether, Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.06.2011

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abp	Aktin-bindendes Protein
ADF	<i>Actin depolymerizing factor</i>
ADF-H	<i>Actin depolymerizing factor homology</i>
ADP	Adenosindiphosphat
Arp	<i>Actin related protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAR	Bin-Amphiphysin-Rvs
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CA	Cornu ammonis
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
Cobl	Cordon-Bleu
COS-7	CV-1 <i>Origin SV40 7</i>
CT	C (Carboxyl)-Terminus
D	Dialysat
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i>
E	Elutionsfraktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
F-Aktin	Filamentöses Aktin
F-BAR	Fes/CIP4-homology-Bin-Amphiphysin-Rvs
FH	<i>Formin homology</i>
G-Aktin	Globuläres Aktin
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GD	Gyrus dentatus
gp	<i>Guinea pig</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat

IgG	Immunglobulin G
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney 293</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His ₆	Histidin ₆
IF	Immunfluoreszenzanalyse in kultivierten COS-7-Zellen oder Neuronen
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemische Untersuchung
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	Körnerzellschicht
KO	<i>Knockout</i>
L	Lysat
m	<i>Mouse</i> (auch: Meter, milli)
M	Molekularschicht
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>
NPF	Asparagin-Prolin-Phenylalanin
NT	N (Amino)-Terminus
N-WASP	<i>Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
P	Purkinje-Zell-Schicht
PACSLN	<i>Protein kinase Ca and casein kinase 2 substrate in neurons</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
ProSAP	<i>Proline-rich synapse-associated protein</i>
PSD	Postsynaptische Dichte
rb	<i>Rabbit</i>
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
RNAi	<i>Ribonucleic acid interference</i>
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>

SH3	<i>Src homology 3</i>
Syndapin	<i>Synaptic dynamin-associated protein</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TRX	Thioredoxin
UM	Ungebundenes Material
W	Waschfraktion
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
WAVE	<i>WASP-family verprolin homology</i>
WB	<i>Western Blotting</i>
WH2	<i>WASP homology 2</i>
WT	Wildtyp

2 INHALTSVERZEICHNIS

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
2 INHALTSVERZEICHNIS	6
3 ZUSAMMENFASSUNG	10
4 EINLEITUNG	12
4.1 Das Aktincytoskelett	12
4.2 Der Aktinnukleator Cobl (Cordon-Bleu)	16
4.3 Zellbiologische Bedeutung bekannter Cobl-Interaktionspartner	18
4.3.1 Aktin-bindendes Protein 1 (Abp1)	18
4.3.2 Die Proteinfamilie der Syndapine	20
4.4 Die Bedeutung des Aktincytoskeletts für neuronale Morphogenese	21
5 ZIELE DER ARBEIT	26
6 METHODIK	28
6.1 Material	28
6.1.1 Bakterienstämme	28
6.1.2 Eukaryotische Zelllinien	28
6.1.3 Mauslinien	28
6.1.4 Rattenstamm	29
6.1.5 Chemikalien und Laborreagenzien	29
6.1.6 Antikörper und Farbstoffe	30
6.1.7 Oligodesoxyribonucleotide, Plasmide und cDNA-Expressionskonstrukte	32
6.1.8 Geräte	33
6.2 Molekularbiologische Methoden	35
6.2.1 Transformation von Hitzeschock-kompetenten Zellen	35
6.2.2 Isolation von Plasmid-DNA	35
6.2.3 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA	35
6.2.4 Genotypisierung von <i>Abp1</i> - und <i>Syndapin I-knockout</i> -Mäusen	36

6.2.4.1 DNA-Extraktion aus Schwanzspitzenbiopsien von Mäusen	36
6.2.4.2 Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
6.2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Charakterisierung der PCR-Produkte ..	37
6.3 Proteinbiochemische Methoden	38
6.3.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
6.3.2 Coomassie Brilliant Blau-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	39
6.3.3 <i>Western Blotting</i>	39
6.3.4 Ponceau S-Färbung	40
6.3.5 Western Blot-Analyse	40
6.3.6 Affinitätsaufreinigung von GST-Fusionsproteinen	40
6.3.7 Affinitätsaufreinigung von Antikörpern gegen His ₆ -TRX-Cobl 175-324 Δ262-286	41
6.3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	42
6.4 Zellkultur-Methoden und Immunocytochemie	42
6.4.1 Zelllinien	42
6.4.1.1 Transfektion von HEK293-Zellen und Erstellung von HEK293-Zell- Lysaten	42
6.4.1.2 Subkultivierung, Transfektion und Immunfluoreszenzfärbung von COS-7-Zellen	43
6.4.2 Primäre Neuronen	45
6.4.2.1 Präparation primärer Neuronen	45
6.4.2.2 Transfektion und Fixierung primärer hippocampaler Neuronen	46
6.4.2.3 Immunfluoreszenzfärbung von primären Neuronen	47
6.4.2.4 Fluoreszenzmikroskopie und quantitative Analyse der dendritischen <i>spines</i>	47
6.4.3 Organotypische Schnittkulturen (Kleinhirn)	48
6.4.3.1 Herstellung von Kleinhirnschnittkulturen und Transfektion mittels <i>Gene Gun</i>	48
6.4.3.2 Fixierung und Färbung der transfizierten Kleinhirnschnittkulturen	49
6.4.3.3 Quantitative Auswertung morphologischer Parameter der Purkinje- Zellen	49

6.5 Immunhistochemische Methoden	50
6.5.1 Fixierung und Präparation muriner Organe	50
6.5.2 Anfertigung und immunhistochemische Färbung von 55 µm-Gehirnschnitten .	51
6.5.3 Anfertigung und immunhistochemische Färbung von 8 µm-Gewebeschnitten .	51
6.5.4 Konfokale Laser- <i>Scanning</i> -Mikroskopie und Bildbearbeitung	52
7 ERGEBNISSE	53
7.1 Aufreinigung und Charakterisierung von polyklonalen anti-Cobl-Antikörpern	53
7.1.1 Anti-Cobl-Antikörper und alternative Cobl-Spleißvarianten	53
7.1.2 Erfolgreiche Aufreinigung von GST-Cobl 175-324	54
7.1.3 Affinitätsaufreinigung der Antikörper anti-Cobl ^{ARA} und anti-Cobl ^{DBY}	55
7.1.4 Charakterisierung der polyklonalen anti-Cobl-Antikörper im Western Blot	55
7.1.5 Charakterisierung der polyklonalen anti-Cobl-Antikörper in Immunfluoreszenzanalysen	56
7.2 Aufreinigung und Charakterisierung von polyklonalen anti-His ₆ -TRX-Antikörpern	60
7.3 Cobl-Expression in corticalen Neuronen	61
7.4 Untersuchungen zur Expression und Funktion von Cobl in hippocampalen Neuronen	63
7.4.1 Analyse der Cobl-Expression	63
7.4.2 Funktionelle Analysen	66
7.5 Untersuchungen zur Expression und Funktion von Cobl im Kleinhirn	73
7.5.1 Analyse der Cobl-Expression	73
7.5.2 Funktionelle Analysen	74
7.6 Cobl-Expression in nicht-neuronalen Geweben	76
7.6.1 Hoden	76
7.6.2 Milz	78
7.6.3 Pankreas	78
7.7 Analysen zur Kolokalisation von Cobl und seinen Interaktionspartnern Abp1 und Syndapin I	80
8 DISKUSSION	86
8.1 Die Rolle von Cobl-vermittelter Aktinnukleation in der Neuromorphogenese	86
8.2 Cobl-Funktionen in nicht-neuronalen Geweben	97
8.3 Mögliche Cobl-Funktionen im Zellkern	102

9 SCHLUSSFOLGERUNGEN	104
10 LITERATURVERZEICHNIS	106
11 ANHANG	120
Abbildungsverzeichnis	120
Tabellenverzeichnis	122
Danksagung	123
Ehrenwörtliche Erklärung	124

3 ZUSAMMENFASSUNG

Neuronale Netze ermöglichen die Integration zahlreicher elektrischer Signale und schaffen unter anderem die Grundlage für Lernprozesse und komplexes Verhalten. Sie zeichnen sich durch dynamische Umstrukturierungen sowie ein hohes Maß an synaptischer Plastizität aus, die insbesondere durch das sowohl stabilisierende als auch dynamische Aktincytoskelett gewährleistet werden. Der Aktinnukleator Cobl (Cordon-Bleu), der die Bildung linearer, unverzweigter Aktinfilamente unterstützt, ist im Gehirn hoch exprimiert und wurde in hippocampalen Neuronen als unabdingbar für frühe neuronale Morphogenese charakterisiert. Aktuelle immunhistochemische Untersuchungen unter Verwendung spezifischer affinitätsgereinigter anti-Cobl-Antikörper bestätigten an Gehirnschnitten 12 Wochen alter Mäuse die Lokalisation von Cobl in hippocampalen Neuronen und zeigten den Aktinnukleator darüber hinaus im Bereich des Cortex cerebri sowie in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns. Um mögliche Cobl-Funktionen in der komplexen Morphogenese von cerebellären Purkinje-Zellen aufzuklären, wurden im Rahmen dieser Arbeit weiterhin organotypische murine Kleinhirnschnittkulturen etabliert, die durch *Gene Gun*-Transfektion den gezielten RNAi-vermittelten Cobl-*knockdown* in Purkinje-Zellen früh postnataler Kleinhirn-Präparationen ermöglichen. Bei reduzierter Cobl-Expression wurde eine signifikante Verminderung der dendritischen Verzweigungspunkte beobachtet. Cobl übernimmt damit eine kritische Rolle in der Ausbildung des elaborierten Dendritenbaumes cerebellärer Purkinje-Zellen, welcher die morphologische Grundlage für die Konnektivität dieser Zellen bildet und die Koordination motorischer Bewegungsabläufe und des Gleichgewichtssinns gewährleistet. Eine maßgebliche Rolle von Cobl-vermittelter Aktinnukleation auch in Prozessen der späten neuronalen Morphogenese, dem initialen Auswachsen sowie der Elongation von Aktin-reichen dendritischen *spines*, zeigten im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analysen nach gezielter Veränderung des Cobl-Expressionsniveaus in primären hippocampalen Neuronen. Der Aktinnukleator Cobl ist damit von essentieller Bedeutung in der Neuomorphogenese hippocampaler Pyramidenzellen und cerebellärer Purkinje-Zellen, die aufgrund ihrer Größe, synaptischen Kontakte und dynamischen Plastizität eine wesentliche Rolle für die Integration elektrischer Signale im neuronalen Netz erfüllen und so unter anderem die Grundlage für komplexe Lernprozesse und Koordination der Motorik schaffen. Neben seiner Bedeutung in der Neuomorphogenese erfüllt das Aktincytoskelett vielfältige weitere physiologische Funktionen, es ermöglicht Zellmigration und -teilung sowie dynamische Membrantransportprozesse. Eine Involvierung von Cobl in einige dieser

Aktinfunktionen hatten Western Blot-Analysen von Rattengeweobshomogenaten nahe gelegt, die Cobl auch in nicht-neuronalen Geweben nachwiesen. Aktuelle immunhistochemische Untersuchungen enthüllten eine spezifische Cobl-Lokalisation in distinkten Kompartimenten bzw. Zelltypen in Hoden, Milz und Pankreas. Besonders bemerkenswert war dabei eine spezifische Detektion der Cobl-Expression in den Langerhans-Inseln des Pankreas, die auf eine Rolle des Aktinnukleators in der Exocytose bzw. kompensatorischen Endocytose hindeutet. Positive Ergebnisse von Koloalisationsanalysen lassen eine Kooperation von Cobl und seinen Interaktionspartnern Abp1 und/oder Syndapin I unter anderem im Rahmen von Membrantransportprozessen vermuten. Weiterhin scheint der Aktinnukleator Cobl, dessen Aminosäuresequenz zwei putative Kernlokalisierungssignale beinhaltet, zumindest zeitweise im Zellkern lokalisiert zu sein und dort zellbiologische Funktionen zu erfüllen.

Zusammenfassend zeigen diese Studien damit die Bedeutung des Aktinnukleators in verschiedenen Stadien der Neuromorphogenese und liefern erste Hinweise darauf, dass die Cobl-vermittelte Bildung neuer Aktinfilamente einen universellen Mechanismus spezialisierter Zellen in verschiedensten Organen darstellt, um strukturelle und funktionelle Organisation und Plastizität zu gewährleisten.

4 EINLEITUNG

4.1 Das Aktincytoskelett

Das Cytoskelett ist ein komplexes Filamentsystem aus Mikrotubuli, Intermediär- und Aktinfilamenten, das gerüstartig eukaryotische Zellen durchspannt und wesentliche Bedeutung für die Zellmorphologie, aber auch komplexe zelluläre Prozesse wie Migration oder Zellteilung hat.

Aktinfilamente, die auch Mikrofilamente genannt werden, erfüllen vielfältige zellbiologische Funktionen und wirken dabei in einem Zusammenspiel mit Aktin-bindenden Proteinen, diversen Adapter- und zellulären Gerüstproteinen. Mit dem Aktincytoskelett assoziierte Proteine ermöglichen unter anderem die Bündelung und Quervernetzung von Aktinfilamenten. Da sie in zahlreiche Signaltransduktionsprozesse zum Cytoskelett involviert sind, haben diese Proteine eine wesentliche Bedeutung für die Regulation der Aktindynamik.

Die herausragende Bedeutung des Aktincytoskeletts für die zelluläre Morphologie wird an den unterschiedlichen Strukturen deutlich, in deren Ausbildung Aktin involviert ist. So bewirken Aktinfilamente mechanische Stabilität insbesondere am Zellcortex. Sie sind sowohl integraler Bestandteil von Filopodien, länglich-dünnen Plasmamembranausstülpungen (Mattila und Lappalainen 2008), als auch maßgeblich an der Ausbildung von breitflächigen Lamellipodien beteiligt (Small et al. 2008), welche Zellmigration sowie Phagocytoseprozesse ermöglichen. Als Stressfasern gewährleisten stabile Aktinbündel eine Kraftübertragung innerhalb der Zelle (Pellegrin und Mellor 2007). Insbesondere in strukturell hoch spezialisierten Zellen wie Neuronen, deren Morphologie und Plastizität wesentliche Voraussetzungen für die Erfüllung ihrer Funktion im Zellverband sind, sind Aktinfilamente unerlässlich. An der Cytokinese ist Aktin entscheidend beteiligt, in dem es im kontraktilen Ring in Verbindung mit Myosin II zur Durchschnürung der Mutterzelle beiträgt (Pollard 2010). Weiterhin geht man von einer maßgeblichen Bedeutung des dem Zellcortex unterliegenden Aktincytoskeletts in der Ausbildung und Positionierung des Spindelapparates (Azoury et al. 2008) sowie der Abrundung der Zellen während Mitose und Meiose aus (Kunda und Baum 2009).

Das dynamische Aktincytoskelett gewährleistet intrazelluläre Membrantransportprozesse und ist in die Bewegung von Vesikeln involviert, für deren zellbiologische Funktion eine gerichtete Motilität unerlässlich ist (Merrifield et al. 1999, Rozelle et al. 2000). Aktin

erscheint dabei wie ein Kometenschweif, der die Vesikel durch das Cytoplasma treibt, ganz ähnlich dem Fortbewegungsmechanismus von *Listeria monocytogenes* in Wirtszellen (Lambrechts et al. 2008). Untersuchungen zur Rolle von Aktin in Endocytosevorgängen brachten in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Ergebnisse hervor (Fujimoto et al. 2000, Yarar et al. 2005). Nichtsdestotrotz könnte das corticale Aktincytoskelett zumindest in neuronalen Zellen nach dem von Qualmann et al. (2000) vorgeschlagenen Mechanismus maßgeblich in alle Stadien des Clathrin-vermittelten endocytotischen Prozesses involviert sein. Gerichtete Polymerisationsprozesse würden demnach zur Invagination der Plasmamembran führen, zur Einengung des Vesikelhalses beitragen sowie die Bewegung des endocytotischen Vesikels in das Zellinnere unterstützen (siehe auch Merrifield et al. 2002). Komplexe Prozesse wie diese erfordern eine strenge zeitliche und räumliche Regulation sowie eine koordinierte Zusammenarbeit aller beteiligten Komponenten. Eine Schlüsselfunktion für Endocytosevorgänge hat die große GTPase Dynamin, die als mechanochemisches Enzym die Abschnürung entstandener Vesikel von der Plasmamembran katalysiert (Praefcke und McMahon 2004). Über seine C-terminale Prolin-reiche Domäne kann Dynamin mit der SH3-Domäne eines weiteren Proteins interagieren und damit akzessorische Proteine zu Orten endocytotischer Aktivität rekrutieren bzw. selbst dorthin lokalisiert werden. Potenzielle Bindungspartner sind dabei unter anderem Amphiphysin, Endophilin und Syndapin, die zum einen sehr unterschiedliche Funktionen während der Vorbereitung und der eigentlichen Vesikelabschnürung übernehmen und zum anderen selbst weitere an der Endocytose beteiligte Faktoren rekrutieren können (Slepnev und De Camilli 2000).

Aktinfilamente bilden mit einem Durchmesser von 5 bis 7 nm die feinste Komponente des zellulären Skeletts. Sie verleihen jeder eukaryotischen Zelle in besonderem Maße sowohl Stabilität als auch regulierte Dynamik. Aktin kann dabei in zwei ineinander konvertierbaren Formen auftreten – als globuläre G-Aktin-Monomere oder als filamentöses F-Aktin. Garrels und Gibson (1976) beschrieben erstmals die Expression von α -Aktin in differenzierten Muskelzellen sowie die beiden auch in nicht-muskulären Zellen exprimierten Isoformen β - und γ -Aktin. Bis heute wurden in Vertebraten insgesamt sechs verschiedene Isoformen des evolutionär hoch konservierten 42 kDa-Proteins G-Aktin identifiziert. G-Aktin lässt sich in vier Subdomänen einteilen, die zwei durch einen Spalt voneinander getrennte Hälften des Aktinmonomers bilden. In diesem Spalt wird ATP bzw. ADP mit einem divalenten Kation, *in vivo* Mg^{2+} , komplexiert gebunden (Kabsch et al. 1990), was wesentliche Bedeutung für die Polymerisation zu F-Aktin hat. Zwei gleichartig orientierte G-Aktin-Ketten, die sich in Form

einer linksgängigen Helix umeinander winden, bilden ein Aktinfilament (Holmes et al. 1990). In Abhängigkeit von der G-Aktin-Konzentration können ATP-Monomere am Filamentende angelagert oder abgespalten werden. Die anschließende ATP-Hydrolyse resultiert in einem Aktinfilament, das sich mit Ausnahme der Filamentenden aus ADP-Aktin-Untereinheiten zusammensetzt (Straub und Feuer 1950).

Die Konzentration, bei welcher sich ein Gleichgewicht zwischen Assemblierung und Deassemblierung von G-Aktin einstellt, bezeichnet man als kritische Konzentration. Im Hinblick darauf unterscheiden sich die beiden Enden des polaren Filamentes. Man beobachtet bei physiologischen G-Aktin-Konzentrationen ein schnell wachsendes Plus-Ende (*barbed end*) sowie ein Minus-Ende (*pointed end*), an welchem Depolymerisationsprozesse überwiegen. Im Gleichgewichtszustand entspricht die Nettoanlagerung von Aktin an ein Filament der Nettoabspaltung und die Filamentlänge bleibt insgesamt konstant, was als Tretmühlenmechanismus bezeichnet wird (Lodish et al. 2004).

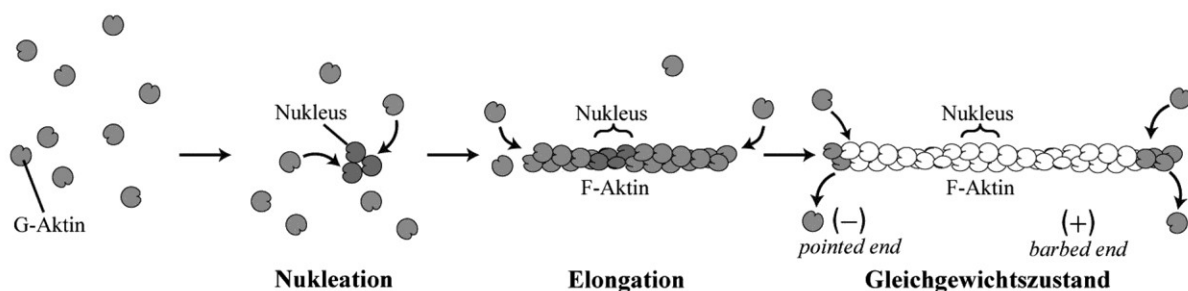


Abb. 1: Die drei Schritte der *in vitro*-Polymerisation von G-Aktin.

Durch sequenzielle Aneinanderlagerung von drei ATP-G-Aktin-Monomeren (grau) entsteht ein trimerer Aktinnukleus, an dem die weitere Elongation des Aktinfilamentes spontan ablaufen kann. Im Gleichgewichtszustand finden Polymerisation und Depolymerisation am (+)- und am (-)-Ende parallel statt. Die ATP-Hydrolyse resultiert in einem Aktinfilament, das sich mit Ausnahme der Filamentenden aus ADP-Aktin (weiß) zusammensetzt (modifiziert nach Lodish et al. 2004).

Die initiale Phase der Bildung eines Filamentes verläuft energetisch sehr ungünstig. Aktinmonomere müssen sich sequenziell zusammenlagern und bilden zunächst instabile Dimere. Nur mit geringer Wahrscheinlichkeit fügt sich vor der Dissoziation dieser Intermediate ein drittes G-Aktin an, sodass ein stabiler Aktinkern (Nukleus) entsteht, an dem die weitere Elongation spontan abläuft (Abb. 1). Spezifische Proteine (Nukleatoren), die sich hinsichtlich molekularen Mechanismus (Abb. 2) sowie Regulation unterscheiden, unterstützen die Entstehung derartiger Aktinkerne.

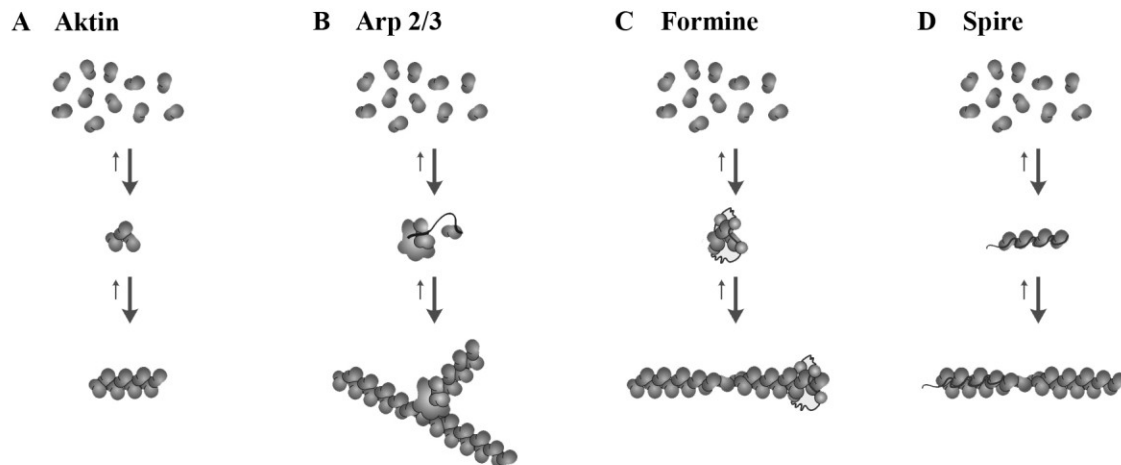


Abb. 2: Verschiedene Mechanismen der Aktinnukleation.

Die initiale Phase der Ausbildung eines Aktinfilamentes (A) verläuft energetisch sehr ungünstig und kann durch spezifische Faktoren unterstützt werden. Dargestellt sind die Nukleationsmechanismen der am besten untersuchten Aktinnukleatoren: Arp2/3-Komplex (B), Formine (C) und Spire (D) (modifiziert nach Goley und Welch 2006).

Der am besten untersuchte Aktinnukleator ist der **Arp2/3-Komplex**, der sich aus Arp2 (*Actin related protein 2*), Arp3 sowie fünf weiteren Untereinheiten zusammensetzt (Millard et al. 2004). Die beiden Arp-Moleküle ähneln monomerem Aktin und nach Rekrutierung eines zusätzlichen G-Aktin über die WH2-Domäne eines Arp2/3-Aktivators entsteht aus diesen Komponenten ein trimerer Nukleus, der zu einem Filament mit freiem Plus-Ende polymerisieren kann. Eine effektive Arp2/3-Komplex-vermittelte Nukleation setzt die Aktivierung durch nukleationsfördernde Faktoren wie WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) oder Proteinen der WAVE (*WASP-family verprolin homology*)-Familie voraus (Machesky und Insall 1998), die ihrerseits durch die kleinen GTPasen Cdc42 und Rac reguliert werden (Goley und Welch 2006). Weiterhin wird die Nukleationsaktivität des Arp2/3-Komplex durch laterale Bindung an ein existierendes Aktinfilament stark erhöht, was schließlich in der Bildung von F-Aktin-Verzweigungen in einem Winkel von 70° resultiert (Pollard und Beltzner 2002). Von Bedeutung sind derartige Strukturen vor allem in der Ausbildung von Membranprotrusionen am Leitsaum migrierender Zellen (Bailly et al. 2001). Im Gegensatz zum Arp2/3-Komplex unterstützen alle weiteren bisher bekannten Aktinnukleatoren die Bildung linearer, unverzweigter Aktinfilamente. Die Multidomänenproteine der **Formine** binden über dimerisierte FH2 (*Formin homology 2*)-Domänen an je ein Aktinmonomer und nukleieren damit zunächst Aktindimere (Pruyne et al. 2002, Xu et al. 2004). Als nukleationsfördernd erwiesen sich Interaktionen zwischen der FH1-Domäne der Formine und den Profilinen (Sagot et al. 2002), Aktinmonomer-bindenden Proteinen, denen die Beschleunigung des ADP-ATP-Austausches in G-Aktin zugeschrieben

wird. Vavylonis et al. (2006) schlugen auf Grundlage dieser Ergebnisse ein Nukleationsmodell vor, nach dem Profilin-Aktin-Komplexe über die FH1-Domäne von Forminen zum Plus-Ende rekrutiert werden und damit die Filamentelongation beschleunigen. Reguliert durch die kleine GTPase Rho haben Formine funktionelle Bedeutung insbesondere in der Ausbildung von Stressfasern sowie des kontraktilen Ringes während Zellteilungsprozessen (Goode und Eck 2007).

2005 wurde mit **Spire** ein weiteres Aktin-nukleierendes Protein beschrieben (Quinlan et al. 2005). Spire besitzt vier *WASP homology 2* (WH2)-Domänen, 25 bis 50 Aminosäuren lange Sequenzen, über deren amphiphatische N-terminale Helix eine Bindung an die hydrophobe Tasche zwischen den Aktinsubdomänen 1 und 3 ermöglicht wird. Durch diesen von Van Troys et al. (1996) erstmals für Thymosin β 4 beschriebenen Mechanismus ist Spire in der Lage, vier G-Aktin-Moleküle zu binden, sie in räumliche Nähe zueinander zu bringen und so die Formation einer tetrameren Aktinkette zu ermöglichen. Die laterale Assemblierung weiterer Aktinmonomere resultiert in einem kurzen linearen Filament mit freiem Plus- sowie einem durch Spire besetzten Minus-Ende (Quinlan et al. 2005). Quinlan et al. (2007) beschrieben die Interaktion zwischen Spire und dem *Drosophila*-Formin Cappuccino sowie ein Zusammenwirken dieser Proteine bei der Aktinnukleation. Obwohl es Hinweise darauf gibt, dass Spire in *Drosophila melanogaster* Oozyten in cytoplasmatische Strömungsprozesse sowie die Koordination von corticalen Aktinfilamenten und Mikrotubuli involviert ist (Rosales-Nieves 2006, Dahlgaard et al. 2007), ist die Funktionalität dieses Proteins noch weitgehend ungeklärt.

Ebenfalls über eine WH2-Domäne vermittelt **Leiomodin** die Aktinnukleation. Das 2001 erstmals beschriebene Protein wird vor allem im Herzen, in glatten Muskelzellen sowie im ausgereiften Skelettmuskel exprimiert (Conley et al. 2001). Der Leiomodin N-Terminus bindet Tropomodulin-ähnlich an zwei Aktinmonomere, sodass der Aktinkern durch Rekrutierung eines weiteren G-Aktins mithilfe der C-terminalen WH2-Domäne vervollständigt werden kann (Chereau et al. 2008). Leiomodin scheint damit muskelspezifisch Aktinfilamente zu nukleieren und an der Ausbildung der Sarkomere beteiligt zu sein.

4.2 Der Aktinnukleator Cobl (Cordon-Bleu)

Ein erst kürzlich durch Ahuja et al. (2007) identifizierter Nukleator, der die Keimbildung von Aktinfilamenten ebenso wie Spire und Leiomodin über WH2-Domänen vermittelt, ist Cobl

(Cordon-Bleu). Cobl besitzt drei hoch konservierte WH2-Domänen am C-Terminus, die individuell jeweils mit unterschiedlicher Affinität monomeres Aktin binden können. Nach dem von Ahuja et al. (2007) vorgeschlagenen Modell zur Cobl-vermittelten Aktinnukleation (Abb. 3 A) binden zunächst die WH2-Domänen (2) und (1) je ein G-Aktin und es kommt aufgrund der räumlichen Nähe zur Aktindimerisierung. Ein stabiler Aktinkern wird durch die kreuzweise Anlagerung eines dritten G-Aktin mittels der WH2-Domäne (3) erreicht, ein Prozess, der durch die große Länge der verbindenden Aminosäurekette (Linker 2) zwischen WH2 (2) und WH2 (3) gewährleistet wird. An diesem stabilen trimeren Aktinkern kann die weitere Aktinpolymerisation spontan ablaufen. Cobl initiiert die Ausbildung unverzweigter, ungebündelter Aktinfilamente und kolokalisiert weiterhin mit F-Aktin-reichen Strukturen am Zellcortex.

Die Analyse verschiedener Gewebehomogenate aus der Ratte zeigte ein sehr hohes Cobl-Expressionsniveau im Gehirn (Abb. 3 B). Cobl wurde mittels Immunfluoreszenz in neuronalen Somata, Axonen sowie Dendriten detektiert und lag angereichert vor allem in F-Aktin-reichen axonalen und dendritischen Wachstumskegeln vor. Nach Cobl-Überexpression in primären hippocampalen Neuronen beobachteten Ahuja et al. (2007) (Abb. 3 C und 3 D) eine Erhöhung von Anzahl und Verzweigungsgrad der Dendriten, während sich die Dendritenlänge verkürzte. Weiterhin erhöhte sich nach Überexpression des WH2-Domänen beinhaltenden Cobl C-Terminus der axonale Verzweigungsgrad bei unveränderter Axonlänge. RNAi-vermittelter Cobl-*knockdown* führte konsistenterweise zu einer Verminderung sowohl der Dendritenanzahl als auch der dendritischen Verzweigungen. Cobl scheint damit von funktioneller Bedeutung für die neuronale Morphogenese zu sein und vor allem in der Neuritogenese sowie der Initiation neuer Verzweigungen eine kritische Rolle zu übernehmen. Erste Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung von Cobl in der neuronalen Entwicklung gab es bereits durch Gasca et al. (1995). Im Rahmen eines *Gene trap*-Insertionsexperimentes wurden das Cobl-Gen und dessen Expression während der Embryonalentwicklung in axialen Mittellinienstrukturen, darunter die Chorda dorsalis, die Bodenplatte des Neuralrohrs sowie der dorsale Vorderdarm, beobachtet. Carroll et al. (2003) vermuteten eine Bedeutung von Cobl für die erfolgreiche Neurulation im Bereich des Mittelhirns, die bisher allerdings noch nicht experimentell bestätigt wurde.

Wie Abb. 3 B zu entnehmen ist, beschränkt sich die Cobl-Expression nicht auf neuronale Gewebe. Das Vorhandensein von Cobl in Hoden, Lunge und Milz legt eine physiologische Bedeutung auch in diesen Organen nahe. Zwei putative Kernlokalisierungssignale (NLS) an

den Aminosäurepositionen 232-249 sowie 670-688 lassen weiterhin Cobl-Funktionen im Zellkern vermuten.

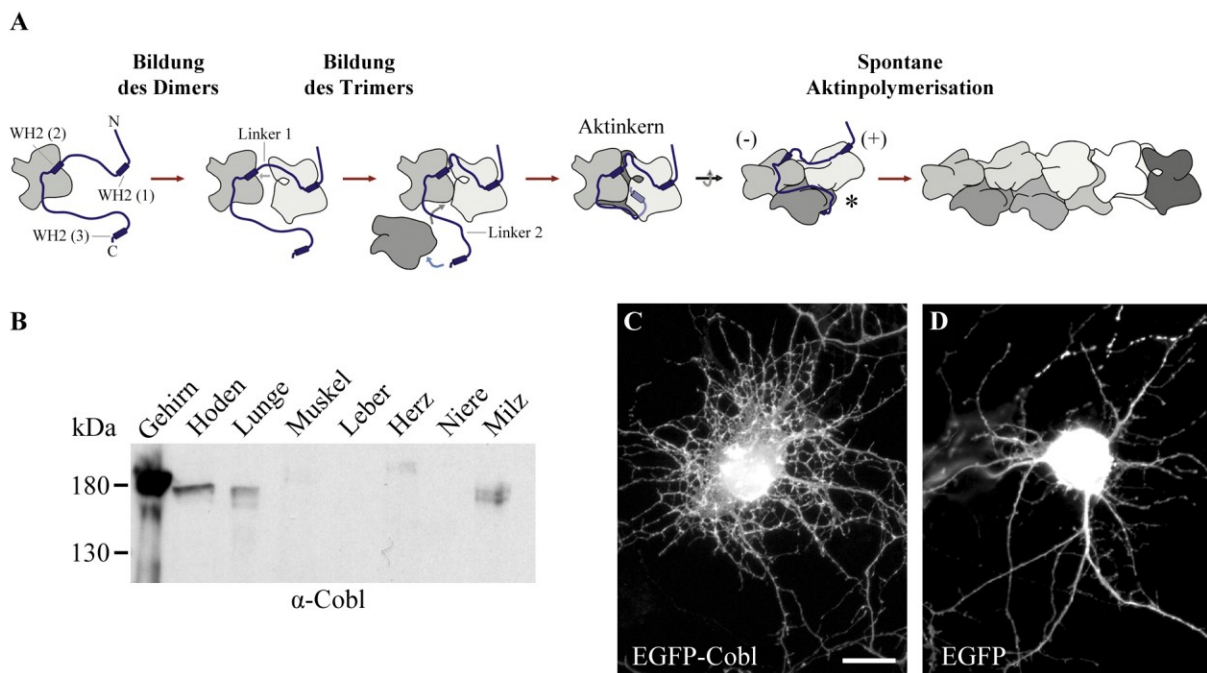


Abb. 3: Der neue Aktin-nukleierende Faktor Cobl (modifiziert nach Ahuja et al. 2007).

Mithilfe der drei Aktin-bindenden WH2-Domänen vermittelt Cobl die initiale Ausbildung eines trimeren Aktinkerns, an dem die weitere Aktinpolymerisation spontan ablaufen kann. Die Western Blot-Analyse verschiedener Gewebekomponenten aus der Ratte zeigt, dass Cobl im Gehirn hoch exprimiert ist und ebenso in Hoden, Lunge und Milz nachgewiesen werden kann. Nach EGFP-Cobl-Überexpression (C) in primären hippocampalen Neuronen am 5. Tag in Kultur wird eine Erhöhung von Dendritenanzahl sowie deren Verzweigungen im Vergleich zu Kontrollzellen (D) beobachtet. Der Balken in C entspricht 15 µm.

Cobl wurde über das Hefe-2-Hybrid-System als Interaktionspartner von Aktin-bindendem Protein 1 (Abp1) und Syndapin I (*Synaptic dynamin-associated protein I*) identifiziert (Ahuja et al. 2007). Cobl-vermittelte Aktinnukleation funktioniert daher möglicherweise in Kooperation mit den zellbiologischen Funktionen von Abp1 und/oder Syndapin I.

4.3 Zellbiologische Bedeutung bekannter Cobl-Interaktionspartner

4.3.1 Aktin-bindendes Protein 1 (Abp1)

Abp1 (Aktin-bindendes Protein 1, SH3P7, HIP-55) wurde erstmals als ein mit Aktin-patches assoziiertes Protein in Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) beschrieben (Drubin et al. 1988). In *Mammalia*-Zellen findet man eine homogene Abp1-Verteilung im Cytoplasma mit Anreicherungen am Zellcortex, wobei Abp1 vor allem zu Regionen intensiver *de novo*-

Aktinpolymerisation rekrutiert wird. Eine Abp1-Lokalisation konnte ebenfalls in Lamellipodien migrierender Zellen beobachtet werden und scheint abhängig von der kleinen GTPase Rac1 zu sein (Kessels et al. 2000).



Abb. 4: Domänen-Organisation von Abp1.

Die ADF-H-Domäne am N-Terminus sowie die sich anschließende helikale Domäne vermitteln die laterale Bindung an F-Aktin. Die C-terminale SH3-Domäne kann mit Prolin-reichen Sequenzen anderer Proteine interagieren.

Abp1, dessen Domänen-Organisation in Abb. 4 dargestellt ist, bindet über die N-terminale ADF-H (*Actin depolymerizing factor homology*)-Domäne sowie einen sich anschließenden helikalen Bereich lateral an F-Aktin (Kessels et al. 2000). Die SH3-Domäne am C-Terminus ermöglicht Interaktionen mit Prolin-reichen Sequenzen anderer Proteine, darunter auch der neue Aktinnukleator Cordon-Bleu (Ahuja et al. 2007). Ein weiterer funktioneller Bindungspartner ist die große GTPase Dynamin (Kessels et al. 2001), welche vor allem zu Plasmamembranbereichen endocytotischer Aktivität rekrutiert wird und dort Vesikelabschnürungsprozesse katalysiert (Praefcke und McMahon 2004). Die Bedeutung der Abp1-Dynamin-Interaktion für endocytotische Prozesse zeigte sich in verschiedenen Experimenten zur rezeptorvermittelten Transferrinaufnahme (Kessels et al. 2001, Mise-Omata et al. 2003). Konsistenterweise wurde in embryonalen Fibroblasten sowie Neuronen aus Abp1-*knockout*-Mäusen eine verminderte Endocytose-Aktivität (Connert et al. 2006) beobachtet.

Mit den hochmolekularen Gerüstproteinen ProSAP1 (*Proline-rich synapse-associated protein 1*)/Shank2 und ProSAP2/Shank3 wurden weitere Bindungspartner identifiziert (Qualmann et al. 2004), die in Kooperation mit Abp1 die Aktin-Dynamik beeinflussen und an der frühen Neuromorphogenese (Pinyol et al. 2007) sowie der Ausbildung dendritischer Dornfortsätze (Haeckel et al. 2008) beteiligt sind. Abp1 kann dabei vermittelt über N-WASP (*neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*) den Aktin-nukleierenden Arp2/3-Komplex aktivieren.

Fenster et al. (2003) beschrieben das präsynaptische Strukturprotein Piccolo als einen Abp1-Interaktionspartner, der die Lokalisierung von Abp1 zu präsynaptischen aktiven Zonen bewirken könnte.

Abp1 könnte somit in neuronalen Zellen als Verbindungsglied für verschiedene Komponenten innerhalb der Prä- und Postsynapse fungieren und dabei stabilisierende Gerüstproteine mit dem Aktincytoskelett sowie dynamischen Membrantransportprozessen, wie sie bei dem

Recycling synaptischer Vesikel oder der Internalisierung bzw. Externalisierung von Neurotransmitterrezeptoren auftreten, vernetzen. Einen Hinweis darauf geben Untersuchungen an *Abp1-knockout*-Mäusen (Connert et al. 2006), im Rahmen derer ein gestörtes Vesikel-Recycling in hippocampalen Boutons beobachtet wurde. Die *Abp1*-defizienten Mäuse fielen weiterhin durch Splenomegalie, Herzinsuffizienz, eine im Vergleich zu wildtypischen Tieren veränderte Lungenstruktur sowie eine Einschränkung von motorischen Fähigkeiten und Koordination auf.

4.3.2 Die Proteinfamilie der Syndapine

Syndapin (*Synaptic dynamin-associated protein*), auch bezeichnet als PACSIN (*Protein kinase Ca and casein kinase 2 substrate in neurons*), wurde in Rattenhirnhomogenat als mit Dynamin-interagierendes Protein identifiziert (Qualmann et al. 1999). In den vergangenen Jahren folgte die Beschreibung mehrerer Syndapin-Isoformen, die sich in ihrem molekularen Aufbau ähneln (Abb. 5), aber unterschiedliche Expressionsmuster zeigen.

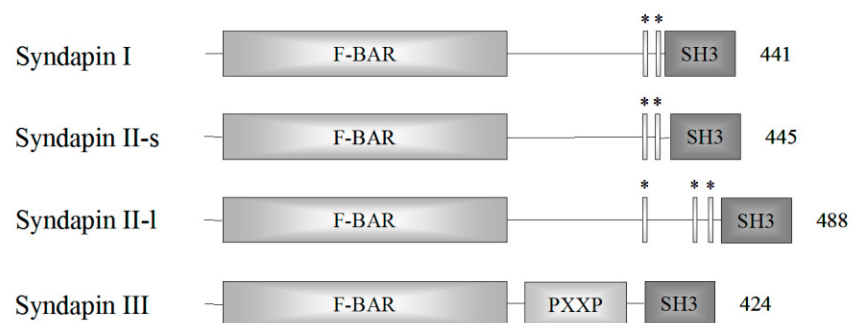


Abb. 5: Domänen-Organisation der Syndapin-Proteinfamilie.

Alle Syndapine besitzen eine F-BAR-Domäne am N-Terminus sowie die C-terminale SH3-Domäne. Von Syndapin II existieren eine kurze (Syndapin II-s) und eine lange (Syndapin II-l) Spleißvariante. * kennzeichnet jeweils ein NPF-Motiv. Während Syndapin I, Syndapin II-s und Syndapin II-l zwei bzw. drei NPF-Motive tragen, beinhaltet Syndapin III stattdessen Prolin-reiche Sequenzen (PXXP).

Während Syndapin I vorwiegend neuronal exprimiert ist (Plomann et al. 1998, Qualmann et al. 1999) und Syndapin II eine ubiquitäre Gewebeverteilung zeigt (Ritter et al. 1999), wurde Syndapin III bisher in der Lunge sowie verschiedenen Muskelgeweben beobachtet (Modregger et al. 2000, Sumoy et al. 2001). Allen Isoformen gemeinsam ist eine N-terminale F-BAR-Domäne. BAR-Domänen bilden bananenförmige Dimere, die über ihre mit positiven Ladungen angereicherte konkave Seite (Peter et al. 2004) mit Membranen interagieren können. Die gebogene Form dient dabei sowohl der Erkennung und stabilisierenden Anlagerung an Membrankrümmungen als auch deren Induktion, was die wesentliche

Funktion von Proteinen mit einer BAR-Domäne in der Tubulierung von Membranen sowie Membrantransportprozessen ermöglicht (Peter et al. 2004, Shimada et al. 2007). Die Kristallstruktur der Syndapin-F-BAR-Domäne konnte kürzlich aufgeklärt werden. Es wurden dabei zwei Syndapin-spezifische *wedge*-Loops identifiziert, die eine zusätzliche Membranverankerung bewirken. Im Rahmen der durch sie vermittelten keilförmigen Destabilisierung der Plasmamembran könnten die *wedge*-Loops auch von wesentlicher Bedeutung für die Vesikelabschnürung während rezeptorvermittelter Endocytose sein (Wang et al. 2009).

Am C-Terminus tragen die Syndapine eine SH3-Domäne, welcher ein PXXP- bzw. mehrere Asparagin-Prolin-Phenylalanin (NPF)-Motive vorgelagert sind. Über die SH3-Domäne können Syndapine Wechselwirkungen mit Prolin-reichen Sequenzen zahlreicher Proteine eingehen, darunter Cobl (Ahuja et al. 2007), die große GTPase Dynamin (Qualmann et al. 1999, Kessels et al. 2006), aber auch der Arp2/3-Komplex-Aktivator N-WASP (Qualmann et al. 1999, Kessels und Qualmann 2002). Die Ausbildung dieser Syndapin-Komplexe hat eine enorme funktionelle Bedeutung für Vesikelabschnürungsprozesse (Qualmann et al. 2000, Kessels und Qualmann 2002, Kessels et al. 2006, Kessels und Qualmann 2006, Andersson et al. 2008, Clayton et al. 2009) sowie für die neuronale Morphogenese (Dharmalingam et al. 2009). In Neuronen Syndapin I-defizienter Mäuse konnten kürzlich vergrößerte präsynaptische Vesikel beobachtet werden, die mit Störungen der synaptischen Transmission sowie epileptischen Anfällen der Versuchstiere einhergingen und auf eine ineffiziente Dynamin-vermittelte Vesikelabschnürung im Rahmen kompensatorischer Endocytose zurückzuführen sein könnten (Koch 2009 [Dissertation]).

Syndapine scheinen eine Vermittlerrolle zwischen Vesikelabschnürungsprozessen sowie kontrollierter Aktinpolymerisation einzunehmen und damit maßgeblich in deren räumliche und zeitliche Koordination involviert zu sein. Wichtige Voraussetzung für die Erfüllung dieser integrativen Funktion ist eine Oligomerisierung der Syndapine, denn nur so können Syndapine gleichzeitig multiple SH3-Domänen-Interaktionspartner binden (Kessels und Qualmann 2006, Halbach et al. 2007).

4.4 Die Bedeutung des Aktincytoskeletts für neuronale Morphogenese

Neuronen stellen morphologisch wie funktionell äußerst komplexe zelluläre Strukturen dar. Über einen ausgedehnten Dendritenbaum empfangen sie elektrische Informationen, die sie im

Bereich ihres Somas integrieren. Das Axon bildet mit den rezeptierenden Nervenzellen synaptische Kontaktstellen und vermittelt die Signalübertragung auf weitere Neuronen. Durch Konvergenz und Divergenz entstehen komplexe neuronale Netze, welche sich durch dynamische Umstrukturierungen und ein hohes Maß an synaptischer Plastizität auszeichnen, womit die Grundlage für Lernprozesse sowie komplexes Verhalten geschaffen wird.

Die neuronale Morphologie entwickelt sich abhängig von den drei Hauptkomponenten des Cytoskeletts – Mikrotubuli, Intermediärfilamente, Aktinfilamente. Während Mikrotubuli die neuronale Zellpolarität beeinflussen sowie wesentlich an der Ausbildung von Axon und Dendriten beteiligt sind (Conde und Cáceres 2009), bestimmen Intermediärfilamente vor allem den Durchmesser und damit die elektrischen Eigenschaften von Axonen (Lariviere und Julien 2003). Das Aktincytoskelett, welches dynamische aber auch stabilisierende Wirkung ausüben kann, scheint in die gesamte neuronale Morphogenese involviert zu sein und ist von herausragender Bedeutung für die strukturelle Plastizität in adulten Nervenzellen (Luo 2002).

Abb. 6 A zeigt schematisch die morphologischen Veränderungen während der Entwicklung eines Neurons, die wesentlich durch Umorganisationsprozesse des Aktincytoskeletts beeinflusst werden (Luo 2002, Kessels et al. 2010).

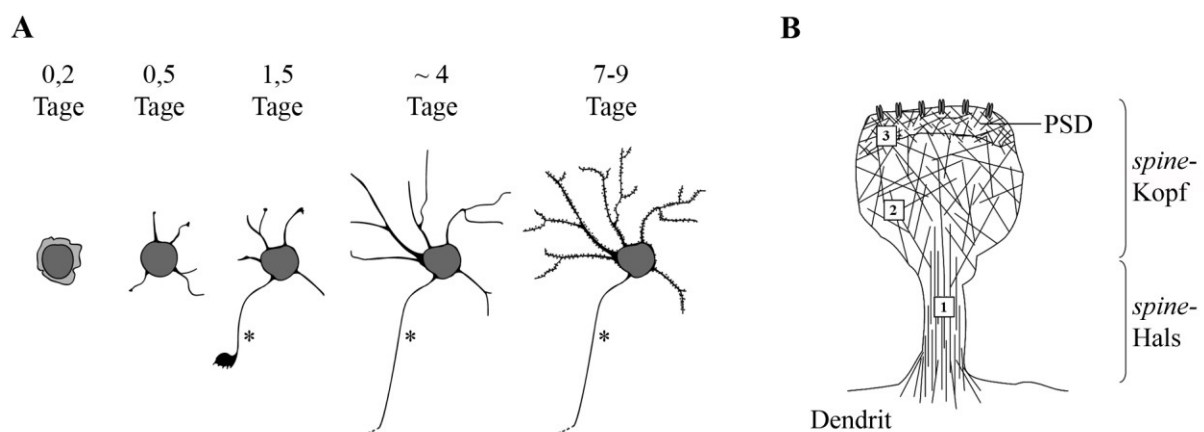


Abb. 6: Morphogenese und *spine*-Ausbildung primärer hippocampaler Neuronen in Kultur.

Aus dem zunächst kugeligen Neuron entwickeln sich ein Axon (*) sowie der verzweigte Dendritenbaum (A, modifiziert nach Kessels et al. 2010). Nach etwa 7 bis 9 Tagen in Kultur bilden sich Dornfortsätze an den Dendriten, dendritische *spines* (B). Funktionelle pilzförmige *spines* lassen sich in *spine*-Kopf sowie *spine*-Hals untergliedern und tragen im Kopfbereich die postsynaptische Dichte (PSD), die unter anderem intrazelluläre Gerüstproteine und Komponenten des Signaltransduktionsapparates beinhaltet. In einem pilzförmigen *spine* kann man drei verschiedene Aktinreservoirs unterscheiden: 1 stabile Aktinfilamente, 2 Aktinfilamente zur dynamischen Verlängerung der *spines*, 3 den *spine*-Kopf aufrecht erhaltende Aktinfilamente.

In primärer Zellkultur konnte beobachtet werden, dass die zunächst kugeligen Neuronen initial mehrere primitive Neuriten ausbilden. Einer dieser Fortsätze zeichnet sich nach etwa

1,5 Tagen durch verstärktes Längenwachstum aus und differenziert sich zum Axon (Dotti et al. 1988). Dessen aufgeweiteter, Aktin-reicher Wachstumskegel entwickelt zahlreiche filopodien- und lamellipodienartige Fortsätze und navigiert das Axon in Abhängigkeit von chemischen und mechanischen Reizen zu seinen Zielstrukturen (Lowery und Van Vactor 2009). Dort entwickelt er sich zu einer präsynaptischen Endigung. Die Differenzierung aller anderen Neuriten beginnt wenige Tage später und ist gekennzeichnet durch weniger progressives Längenwachstum (Dotti et al. 1988) sowie intensive Verzweigungen (Dailey und Smith 1996). Der resultierende Dendritenbaum bildet zahlreiche Filopodien aus, welche sich zu neuen Verzweigungen, nach etwa 7 bis 9 Tagen in Kultur auch zu dendritischen Dornfortsätzen (*spines*) entwickeln können (Dailey und Smith 1996).

Dendritische *spines* sind spezialisierte postsynaptische Strukturen, die in der Regel 0,5 bis 2 μm lang sind und an der Oberfläche von Dendriten beobachtet werden können (Abb. 6 B). Als direkte Rezeptionskompartimente für den Großteil exzitatorischer Synapsen findet man sie vor allem in corticalen und hippocampalen Pyramidenzellen (Peters und Kaiserman-Abramof 1969, Sorra und Harris 2000) sowie in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns, in denen sie von Ramon y Cajal bereits 1888 beschrieben wurden (Cajal 1888).

Die Gestalt der *spines* wird in besonderem Maße von der Stabilität und Dynamik des Aktincytoskeletts bestimmt (Sekino et al. 2007), aber auch Mikrotubuli-Strukturen (Gu et al. 2008) scheinen in die *spine*-Morphogenese involviert zu sein. Anhand morphologischer Kriterien lassen sich *spines*, wie in Abb. 6 B und Abb. 7 (Kapitel 6.4.2.4) dargestellt, verschiedenen Klassen zuordnen (Hering und Sheng 2001).

Pilzförmige (*mushroom*) *spines* besitzen einen voluminösen Kopf, der durch einen schmalen Hals vom dendritischen Schaft abgegrenzt wird. Weiterhin unterscheidet man filopodienartige, dünne (*thin*) *spines* ohne erkennbaren Kopf sowie stummelige (*stubby*) *spines*, welchen eine typische Halsregion fehlt. Die *spine*-Morphologie ist dabei sehr plastisch und kann sich in Abhängigkeit von synaptischer Aktivität verändern (Yuste und Bonhoeffer 2001, Knott und Holtmaat 2008). In verschiedenen Studien wurden im Rahmen der Langzeitpotenzierung vergrößerte *spine*-Köpfe, verkürzte *spine*-Hälsen sowie eine vermehrte Anzahl an *spines* beobachtet (Yuste und Bonhoeffer 2001).

Zur Entwicklung dendritischer *spines* werden sehr unterschiedliche Hypothesen (Miller und Peters 1981, Sotelo 1990, Ziv und Smith 1996, Ethell und Pasquale 2005) vorgeschlagen. Umstritten ist, ob filopodienartige Fortsätze an der Oberfläche von Dendriten, wie von Ziv

und Smith (1996) postuliert, als direkte *spine*-Vorstufen fungieren. Pilzförmige *spines* werden allgemein als ausgereifteste Form anerkannt (Ethell und Pasquale 2005).

Als direkte Rezeptionskompartimente der meisten exzitatorischen Synapsen beeinflussen *spines* maßgeblich deren Stärke und bewirken die Vergrößerung der Oberfläche für synaptische Afferenzen (Shepherd 1996, Sorra und Harris 2000). In Abhängigkeit von ihrer Form und Gestalt können die Dornfortsätze Kompartimente bilden, durch welche eine relative biochemische (Yuste et al. 2000, Sabatini et al. 2001) und elektrische Isolierung (Tsay und Yuste 2004, Araya et al. 2006) einzelner synaptischer Eingänge möglich wird. Sie schaffen damit die Grundlage für Lernen, Gedächtnis und komplexes Verhalten.

Im Rahmen zahlreicher pathologischer Prozesse wurden *spine*-Veränderungen beobachtet (Fiala et al. 2002). *Spine*-Deformationen sowie eine Verringerung der *spine*-Dichte wurden im Zusammenhang mit traumatischen Läsionen, Morbus Alzheimer und mentaler Retardierung beschrieben. Bei sensorischer Deprivation, Schizophrenie und Down-Syndrom konnten deutlich verkleinerte Dornfortsätze beobachtet werden. Auch Stoffwechsel-Speichererkrankungen können mit ektopischen *spines* einhergehen. All diesen pathologischen Erscheinungsformen liegen Störungen der Ausbildung und Aufrechterhaltung, Reifung sowie der strukturellen Plastizität dendritischer *spines* zugrunde. Unklar sind dabei jedoch der exakte Pathomechanismus sowie, ob es aufgrund der neuronalen Unfähigkeit, normale *spines* auszubilden, zu Erkrankungen des Nervensystems kommt oder ob neuronale Erkrankungen synaptische Interaktionen stören, was schließlich in *spine*-Deformationen resultiert (Fiala et al. 2002).

Aktinanreicherungen in dendritischen *spines* wurden schon von Matus et al. (1982) sowie Landis und Reese (1983) beobachtet. Aufgrund unterschiedlicher Dynamik und Funktionalität unterscheidet man heute, wie in Abb. 6 B dargestellt, verschiedene Aktinreservoirs (Bramham 2008). Stabile Aktinfilamente an der Basis von Dornfortsätzen dienen vor allem der Strukturhaltung und bestimmen so die Dichte dieser dendritischen Oberflächenspezialisierungen. Honkura et al. (2008) schlagen weiterhin eine Aktinanreicherung vor, die im Kopfbereich für die *spine*-Verlängerung in Abhängigkeit von synaptischer Aktivität verantwortlich sein soll. Die Ausbildung und Aufrechterhaltung des *spine*-Kopfes, der die synaptische Kontaktstelle darstellt, scheint dagegen vor allem durch dynamische Aktinpolymerisation und -depolymerisation gewährleistet zu werden (Star et al. 2002). Funktionelle dendritische Dornfortsätze tragen im Kopfbereich die postsynaptische Dichte (PSD), eine Protein-reiche Cytomatrix, innerhalb derer dynamische

Signaltransduktionsprozesse zwischen Neurotransmitterrezeptoren, intrazellulären Signalproteinen, aber auch dem Cytoskelett stattfinden (Okabe et al. 2007). Assoziierte Aktinfilamente tragen zur Verankerung der molekularen Bestandteile der PSD bei (Kuriu et al. 2006) und haben eine wesentliche Bedeutung für die Ausstattung der postsynaptischen Membran mit Neurotransmitterrezeptoren, in dem sie an deren lateraler Diffusion in der Zellmembran sowie In- und Externalisierung maßgeblich beteiligt sind (Newpher und Ehlers 2008).

Die vielfältigen Aufgaben, die sowohl stabile als auch dynamische Aktinfilamente in Hinblick auf Morphogenese und Funktionalität dendritischer Dornfortsätze übernehmen, verdeutlichen die existenzielle Bedeutung dieser cytoskelettalen Komponente sowie assoziierter und regulatorischer Proteine für synaptische Transmissions- und Integrationsprozesse.

5 ZIELE DER ARBEIT

Cytoskelettale Funktionen und deren komplexes Zusammenspiel mit Membrantransportprozessen bilden die Grundlage für zelluläre Funktionen wie Zellbewegung und -polarität sowie die besondere Leistungsfähigkeit von sekretorischen Zellen. Das kortikale Aktincytoskelett unterstützt und formt die Plasmamembran, wobei es sowohl Stabilität als auch dynamische Bewegungen und Membrantransportprozesse ermöglicht. Es ist damit für die Bildung, Reifung und Reorganisation zellulärer Netzwerke unabdingbar. Zahlreiche regulatorische Proteine beeinflussen auf der einen Seite die Dynamik auf der anderen Seite die Stabilität der Aktinfilamente. Über Signaltransduktionswege zum Cytoskelett kann F-Aktin so in Abhängigkeit von zellulären Erfordernissen zeitlich und räumlich streng koordiniert polymerisieren, depolymerisieren, parallel gebündelt oder auch netzwerkartig verknüpft werden. Der erst kürzlich identifizierte Aktinnukleator Cobl (Cordon-Bleu) fördert durch Bildung eines trimeren Aktinkerns die *de novo*-Polymerisation linearer, unverzweigter Aktinfilamente (Ahuja et al. 2007).

Die in Western Blot- und ersten Immunfluoreszenz-Analysen von Ahuja et al. (2007) beobachtete hohe Expression von Cobl im Gehirn steht dabei im Einklang mit den besonderen Anforderungen an die hoch spezialisierten neuronalen Zellen, die eine sowohl strukturell als auch funktionell komplexe Organisation und Plastizität aufweisen. Unabdingbar für ein tiefer gehendes Verständnis der Rolle des Aktinnukleators Cobl in neuronaler Struktur und Funktion sind genaue Erkenntnisse zur Cobl-Lokalisation in spezifischen Hirnregionen und Zelltypen, die im Rahmen dieser Arbeit mittels Immunfluoreszenzfärbungen in primären Neuronen der Ratte sowie immunhistochemisch an Gehirnschnitten aus der Maus erzielt werden sollen. Die Aufreinigung und Charakterisierung spezifischer, affiner anti-Cobl-Antikörper ist eine notwendige Voraussetzung für eine derartige Analyse.

Durch die gezielte Veränderung des Expressionsniveaus sowie phänotypische Analysen in endogen Cobl-exprimierenden Zelltypen soll schließlich die physiologische Bedeutung des Aktinnukleators für die neuronale Morphogenese beleuchtet werden. In primären hippocampalen Neuronen beeinflusst Cobl die Anzahl axonaler und insbesondere dendritischer Verzweigungen sowie die Dendritenlänge, Prozesse der frühen Neuromorphogenese (Ahuja et al. 2007). Während späterer Entwicklungsphasen bilden sich Dornfortsätze (dendritische *spines*) als postsynaptische Spezialisierungen an der Oberfläche von Dendriten. Diese *spines* beeinflussen die synaptische Transmission maßgeblich und besitzen ein ausgeprägtes Aktincytoskelett (Matus 2000). Es ist daher eine attraktive

Arbeitshypothese, dass der neue, äußerst potente Aktinnukleator Cobl nicht nur einen Effektor der frühen Morphogenese darstellt, sondern möglicherweise auch als räumlicher und funktioneller Organisator in dendritischen *spines* fungiert. In dieser Studie soll die funktionelle Rolle von Cobl-vermittelter Aktinnukleation in der Ausbildung und Reifung dendritischer *spines*, Prozessen der späten neuronalen Morphogenese, untersucht werden. Einen weiteren Schwerpunkt morphogenetischer Untersuchungen werden die cerebellären Purkinje-Zellen bilden, die sich durch die Entwicklung eines komplexen Dendritenbaumes auszeichnen und deshalb Cobl-Funktionen während ihrer Neuromorphogenese vermuten lassen. Morphologieveränderungen sind eine wesentliche Voraussetzung für neuronale Plastizität, einer ausschlaggebenden Funktion für Lernen und Gedächtnis, können aber auch mit einer Reihe neuropathologischer Prozesse einher gehen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien sollen einen maßgeblichen Beitrag zum Verständnis cytoskelettaler Funktionen in der Hirnentwicklung und -plastizität liefern und damit die Grundlage für ein besseres Verständnis neuropathologischer Prozesse schaffen.

Physiologische Funktionen des Aktinnukleators Cobl zusätzlich zur Neuromorphogenese werden durch Western Blot-Analysen nahe gelegt, in denen sich auch in den nicht-neuronalen Gewebekomponenten von Hoden, Lunge und Milz ein positives Cobl-Signal detektieren ließ (Ahuja et al. 2007). Die genannten Organe sollen im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls immunhistochemisch analysiert werden, um die Cobl-Expression näher auf spezifische Geweberegionen, Zelltypen und gegebenenfalls subzelluläre Kompartimente eingrenzen zu können. Kollokalisationsuntersuchungen können schließlich Hinweise auf mögliche funktionelle Interaktionen von Cobl und seinen Bindungspartnern Abp1 und Syndapin I *in vivo* geben.

Von dieser Studie sind damit wesentliche Einsichten in die physiologische Bedeutung des Aktinnukleators Cobl in der neuronalen Morphogenese sowie erste Hinweise auf mögliche Cobl-Funktionen in nicht-neuronalen Geweben zu erwarten.

6 METHODIK

6.1 Material

6.1.1 Bakterienstämme

Alle verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Firma
XL10-Gold®	endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet ^R F'[proAB lacI ^q Z ΔM15 Tn10(Tet ^R Amy Cm ^R)]	Stratagene, La Jolla, USA
BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3) pLysS(cmR)	GE Healthcare, München

6.1.2 Eukaryotische Zelllinien

Die permanenten Zelllinien COS-7 (renale Fibroblasten, *Chlorocebus aethiops*) und HEK293 (embryonale Nierenzellen, *Homo sapiens*) wurden zur rekombinanten Proteinüberexpression verwendet.

6.1.3 Mauslinien

Zur Aufklärung von *in situ*-Immunlokalisationen erfolgte die Präparation verschiedener Gewebe der Maus (*Mus musculus*). Die Gewebe wurden aus wildtypischen (+/+) und mutanten (-/-) Abp1- bzw. Syndapin I-Mäusen gewonnen, welche aus eigener Zucht stammten. Tabelle 2 zeigt den Hintergrund der jeweiligen Tiere. Ursprünglich waren die Abp1 (-/-)-Tiere durch Connert et al. (2006) etabliert worden. Die Generierung der Syndapin I (-/-)- Mäuse erfolgte innerhalb der Arbeitsgruppe (Koch 2009 [Dissertation]), wobei der *knockout* auf DNA- sowie Proteinebene bestätigt wurde.

Tabelle 2: Hintergrund der Wildtyp- und *knockout*-Mäuse für Abp1 und Syndapin I

Abp1 (+/+) und Abp1 (-/-)	Syndapin I (+/+) und Syndapin I (-/-)
50,00% BALB/c 43,75% C57/BL6J 6,25% 129/SV	87,5% C57/BL6J 2,5% 129/SV

Die Herstellung von Kleinhirnschnittkulturen erfolgte aus Geweben von NMRI-Mäusen, die von der Arbeitsgruppe um Dr. Heike Heuer (Leibniz-Institut für Altersforschung - Fritz-Lipmann-Institut e.V., Jena) zur Verfügung gestellt wurden.

6.1.4 Rattenstamm

Primäre hippocampale und corticale Neuronen sowie komplette Rattengehirne wurden aus Tieren des Wistar-Stammes (*Rattus norvegicus*) präpariert.

6.1.5 Chemikalien und Laborreagenzien

B27 <i>Serum-Free Supplement</i> (50x)	Gibco® Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DMEM	Gibco® Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DNase I	Roche Applied Science, Mannheim
dNTP Set, 100 mM <i>solutions</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Fluoromont-G™	Southern Biotech, Birmingham, USA
Fötale Kälberserum	HyClone qb perbio, Logan, USA
L-Glutamin	Gibco® Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HBSS mit Phenolrot, ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Gibco® Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HBSS ohne Phenolrot, ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Gibco® Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>High-Affinity GST Resin</i> (50% <i>slurry</i>)	Genscript Corp., Piscataway, USA
Ketamin	DeltaSelect GmbH, Dreieich
Lipofectamin™ 2000 <i>Transfection Reagent</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lipofectamin™ LTX and Plus <i>Reagent</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Calbiochem, La Jolla, USA
Neurobasal™ Medium	Gibco® Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Opti-MEM	Gibco® Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PCR-Puffer (10x)	QIAGEN GmbH, Hilden
Penicillin-Streptomycin (Penicillin G, Natriumsalz 10.000 U/ml; Streptomycinsulfat 10.000 µg/ml)	Gibco® Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pferdeserum	Gibco® Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pierce® <i>ECL Western Blotting Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
<i>Protease Inhibitor Cocktail complete</i>	Roche Applied Science, Mannheim
<i>Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free</i>	Roche Applied Science, Mannheim
Rompun	Bayer GmbH, Leverkusen

Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Saponin	Calbiochem, La Jolla, USA
TopTaq DNA-Polymerase	QIAGEN GmbH, Hilden
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Europe B. V., Zoeterwoude, Niederlande
2-YT-Broth	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ziegenserum	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen) und Serva Feinbiochemica (Heidelberg) bezogen. Bidestilliertes Wasser wurde aus der Reinstwasser-Anlage Milli-Q® Gradient (Millipore, Billerica, USA) entnommen.

Die Zusammensetzung von verwendeten Pufferlösungen, Medien und Zusätzen wird bei den entsprechenden Methoden aufgeführt. Pufferlösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Die Medien für die Bakterienkultur wurden vor der Verwendung autoklaviert (15 min, 121°C, 240 kPa).

6.1.6 Antikörper und Farbstoffe

Alle verwendeten und in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgeführten Antikörper sind polyklonal, soweit nicht anders angegeben. Die Sekundärantikörper richten sich jeweils gegen die schwere und leichte Kette von IgG.

Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper

Spezifität	Antigen	Spezies	Verdünnung	Quelle
Abp1 (gp5)	Abp1 282-370	Meerschweinchen	WB - IF - IHC 1:50	Kessels et al. (2000)
Cobl ^{ARA} (rb)	Cobl 175 – 324 Δ262 – 286	Kaninchen	WB 1:100 IF 1:100 IHC 1:50	R. Ahuja, affinitätsgereinigt von J. Grimm
Cobl ^{ARA} (gp1)	Cobl 175 – 324 Δ262 – 286	Meerschweinchen 1	WB 1:100 IF 1:100 IHC -	R. Ahuja, affinitätsgereinigt von J. Grimm
Cobl ^{ARA} (gp2)	Cobl 175 – 324 Δ262 – 286	Meerschweinchen 2	WB 1:100 IF 1:100 IHC -	R. Ahuja, affinitätsgereinigt von J. Grimm
Cobl ^{DBY} (rb)	Cobl 750 – 1005	Kaninchen	WB 1:500 IF 1:500 IHC 1:50	L. Schwintzer, affinitätsgereinigt

Tabelle 3 (Fortsetzung): Verwendete primäre Antikörper

GFP (rb)	GFP	Kaninchen	WB 1:1.000 IF 1:500 IHC -	Abcam Inc., Cambridge, USA
His ₆ - TRX ^{ARA} (rb)	His ₆ -TRX	Kaninchen	WB 1:100 IF 1:100 IHC 1:50	R. Ahuja, affinitätsgereinigt von J. Grimm
His ₆ - TRX ^{DBY} (rb)	His ₆ -TRX	Kaninchen	WB 1:500 IF 1:500 IHC 1:50	L. Schwintzer, affinitätsgereinigt
Insulin (gp)	Insulin	Meerschwein- chen	WB - IF - IHC 1:100	Abcam Inc., Cambridge, USA
Syndapin BE6 (gp1)	Syndapin I 1-382	Meerschwein- chen	WB - IF - IHC 1:100	Braun et al. (2005)
Synapsin (m)	Synapsin	Maus (monoklonal)	WB - IF 1:500 IHC -	Synaptic Systems GmbH, Göttingen

Legende:

gp *guinea pig*, IF Immunfluoreszenzanalyse in kultivierten COS-7-Zellen oder Neuronen, IHC immunhistochemische Untersuchung, m *mouse*, rb *rabbit*, WB *Western Blotting*.

Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper

Spezifität	Spezies	gekoppelt mit	Verdünnung	Quelle
Kaninchen	Ziege	Alexa Fluor™ 488	IF 1:1.000 IHC - WB -	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Kaninchen	Ziege	Alexa Fluor™ 568	IF 1:1.000 IHC 1:1.000 WB -	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Kaninchen	Ziege	Meerrettich- peroxidase	IF - IHC - WB 1:15.000	Dianova GmbH, Hamburg
Maus	Esel	Alexa Fluor™ 488	IF 1:1.000 IHC - WB -	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Meerschweinchen	Ziege	Alexa Fluor™ 488	IF 1:1.000 IHC 1:1.000 WB -	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Meerschweinchen	Ziege	Alexa Fluor™ 568	IF 1:1.000 IHC - WB -	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Meerschweinchen	Ziege	Meerrettich- peroxidase	IF - IHC - WB 1:25.000	Dianova GmbH, Hamburg

Legende:

IF Immunfluoreszenzanalyse in kultivierten COS-7-Zellen oder Neuronen, IHC immunhistochemische Untersuchung, WB *Western Blotting*.

6.1.7 Oligodesoxyribonucleotide, Plasmide und cDNA-Expressionskonstrukte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxyribonucleotide (*Primer*), Plasmidvektoren und cDNA-Expressionskonstrukte sind in den Tabellen 5, 6 und 7 aufgeführt. Alle verwendeten cDNA-Klone stammen aus der Maus (*Mus musculus*). Die *Primer* wurden von der Firma biomers.net GmbH (Ulm) bezogen.

Tabelle 5: Verwendete Oligodesoxyribonucleotide (*Primer*)

Primer	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
BQ 497	AAG GGA GTC TGG ATG CAA GG	Genotypisierung von Mäusen Syndapin I (+/+)
BQ 498	ATC TGA GGA GAC CCA TTC AG	Genotypisierung von Mäusen Syndapin I (-/-)
BQ 502	AGA GAT GTT GAG ATG TGT AC	Genotypisierung von Mäusen Syndapin I (+/+)
BQ 536	CGG TAG AAT TGA CGA AGT TCC	Genotypisierung von Mäusen Syndapin I (-/-)
BQ 673	GAA GAG CCT GGC ATG ACC TGT GC	Genotypisierung von Mäusen Abp1 (-/-)
BQ 674	GGC TCT ATG GCT TCT GAG GCG GA	Genotypisierung von Mäusen Abp1 (-/-)
BQ 675	CTG CTG TCT ACC CTC AGG CTA TG	Genotypisierung von Mäusen Abp1 (+/+)
BQ 676	GCC AGC CAC ACG GAT GTC ATT GC	Genotypisierung von Mäusen Abp1 (+/+)

Tabelle 6: Verwendete Plasmidvektoren

Vektor	Verwendung	Herkunft
pGEX-5x-1	Expressionsvektor für GST-Fusionsproteine in Bakterien	GE Healthcare, München
pEGFP-C2	Expressionsvektor für GFP-Fusionsproteine in Mammalia-Zellen	Takara Bio Europe / Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
pET-32a(+)	Expressionsvektor für His ₆ -Thioredoxin (TRX)-Fusionsproteine in Bakterien	EMD Novagen® Brand, Madison, USA
pRNAT-H1.1/Hygro	RNAi-Expressionsvektor in Mammalia-Zellen	GenScript Corp., Piscataway, USA
pMCherry-F	farnesyliertes Cherry zur Darstellung kleinster morphologischer Strukturen nach Expression in Mammalia-Zellen	Prof. Dr. M. Korte, TU Braunschweig

Tabelle 7: Verwendete cDNA-Expressionskonstrukte

Laborcode	Protein	Vektor
AJI2	Cobl 1176-1337	pEGFP-C2
AMM1	Cobl 1-408	pEGFP-C2
AMQ7	Cobl 1-1337	pEGFP-C2
AOT1	Cobl 175-324 Δ 262-286	pEGFP-C2
ARA1	Cobl 175-324 Δ 262-286	pET-32a(+)
CNI2	Cobl 750-1005	pEGFP-C2
DCF1	Cobl 175-324	pGEX-5x1
DFQ1	Cobl 1-408, 1176-1337 Δ 262-286	pEGFP-C2
DBY1	Cobl 750-1005	pET-32a(+)

Zur Verringerung der Cobl-Expression wurde weiterhin das RNAi-Konstrukt CHJ eingesetzt, das sich gegen die den Basenpaaren 469 bis 476 der Cobl-DNA zugehörige mRNA richtet und in dem Vektor pRNAT-H1.1/Hygro vorlag (Ahuja et al. 2007).

6.1.8 Geräte

Chemolumineszenz *Imager*

CHEMOCAM HR16

Intas Science Imaging Instruments GmbH,
Göttingen

Gene Gun

Helios® *Gene Gun System*

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Kryostat

Open-Top-Kryostat CM 3050S

Leica Microsystems GmbH, Nussloch

Mikroskope

Axiovert 135M

mit Quecksilberdampflampe HBO 50

Carl Zeiss AG, Jena

Vorschaltgerät *tempcontrol* 37-2

Carl Zeiss AG, Jena

Axio Imager.D1

mit Quecksilberdampflampe HBO 100

Carl Zeiss AG, Jena

Vorschaltgerät	Leistungselektronik Jena GmbH, Jena
CCD-Kamera RT <i>Monochrome SPOT</i>	Visitron Systems GmbH, Puchheim
Stromversorgung RT <i>Power Supply SPOT</i>	Visitron Systems GmbH, Puchheim
Software SPOT <i>Advanced 3.5</i>	Visitron Systems GmbH, Puchheim
Konfokales Laser- <i>Scanning</i> - Mikroskopsystem Leica TCS SP5	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Inverses Mikroskop DMI6000	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Mikrotom	
Schlittenmikrotom SM 2000R	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Photometer	
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
SDS-PAGE	
Mini-Protean® 3 <i>Cell Casting Chamber</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-Protean® 3 <i>Cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Stromversorgung Consort E865	Consort nv, Turnhout, Belgien
<i>Tissue-Chopper</i>	
McIlwain™ TC 752	Stoelting Co., Dublin, Irland
Ultraschallhomogenisator	
Sonopuls HD 70	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Western Blot-Apparatur	
Trans-Blot SD <i>Semidry Transfer Cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1 Transformation von Hitzeschock-kompetenten Zellen

Für die Transformation von Plasmiden in kompetente *E. coli*-Zellen wurden verschiedene Bakterienstämme verwendet. Die Amplifikation von Plasmiden erfolgte in *E. coli* XL10-Gold, während Bakterien des Stammes *E. coli* BL21 zur Überexpression von rekombinanten Fusionsproteinen zum Einsatz kamen. Aliquots à 100 µl kompetenter *E. coli* lagen innerhalb der Arbeitsgruppe vor und wurden auf Eis aufgetaut. Es erfolgte die Zugabe von 0,3 bis 0,5 µg DNA und der gesamte Ansatz inkubierte 3 min auf Eis. Im Anschluss daran fand die Hitzeschock-Transformation der kompetenten Bakterien für 50 s bei 42°C im Wasserbad statt. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden die transformierten *E. coli* zu 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum gegeben und darin für 1 h bei 37°C geschüttelt. Von dieser Zellsuspension wurden direkt 100 µl auf eine LB-Agar-Platte mit Antibiotikum ausplattiert, welche über Nacht bei 37°C inkubierte.

- | | |
|-------------------|---|
| • LB-Medium | 10 g Trypton/Pepton, 5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt in 1 l H ₂ O (pH 7.2) |
| • LB-Agar-Platten | 15 g Agar in 1 l LB-Medium |
| • Ampicillin | 100 µg/ml in LB-Agar |
| • Kanamycin | 25 µg/ml in LB-Agar |

6.2.2 Isolation von Plasmid-DNA

Von der Agarplatte, auf der über Nacht Kolonien von plasmidhaltigen *E. coli*-Klonen gewachsen waren, konnten mit einer sterilen Pipettenspitze Bakterienzellen abgenommen werden. Mit diesen wurden jeweils 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft. Die Kulturen inkubierten über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator (300 Upm). Am Folgetag wurden die Bakterien für 5 min bei 6.000 x g abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA unter Verwendung des Kits NucleoSpin® Plasmid der Firma Machery & Nagel, Düren. Es wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Die Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

6.2.3 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Die Konzentration der Plasmid-DNA konnte photometrisch bestimmt werden, da die aromatischen Ringe der Basen von Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweisen. Desweiteren konnten nach Ermittlung des Quotienten A₂₆₀/A₂₈₀ Aussagen zu

eventuellen Verunreinigungen der DNA durch Proteine und damit zur Reinheit der DNA-Präparation getroffen werden. Zur Transfektion in primäre hippocampale Neuronen wurde ausschließlich Plasmid-DNA mit einer Reinheit von $> 1,7$ verwendet.

6.2.4 Genotypisierung von Abp1- und Syndapin I-knockout-Mäusen

6.2.4.1 DNA-Extraktion aus Schwanzspitzenbiopsien von Mäusen

Um den genetischen Status der für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendeten Mäuse zu überprüfen, erfolgte nach Anästhesie der Tiere (Kapitel 6.1.3) eine Schwanzspitzenbiopsie. Dazu wurden circa 1-3 mm der Schwanzspitze entfernt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Nach Zugabe von 500 μ l TC-Puffer sowie 20 μ l Proteinase K-Lösung inkubierten die Gewebeproben über Nacht bei 55°C und 1.000 Upm im Thermoschüttler. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Hitzeinaktivierung der Proteinase K bei 95°C für 10 min. Das Lysat wurde für 5 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand, in welchem sich auch das genetische Material befand, konnte für die Genotypisierung mittels PCR eingesetzt werden.

- TC-Puffer 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- Proteinase K-Lösung 10 mg/ml Proteinase K, 40% (w/v) Glycerin,
1 mM Calciumacetat, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

6.2.4.2 Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die aus den Schwanzspitzenbiopsien extrahierte DNA wurde mittels PCR amplifiziert. In Abhängigkeit von der DNA-Matrize und den verwendeten *Primern* entstanden spezifische PCR-Produkte, die mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert wurden.

Die Genotypisierung von Abp1 (+/+)- bzw. Abp1 (-/-)-Mäusen wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

25 μ l-PCR-Ansatz:

3,0 μ l	Lysat
0,2 mM	dNTP-Mischung
1,0 μ M	Vorwärtsprimer
1,0 μ M	Rückwärtsprimer
2,5 μ l	10x PCR-Puffer
0,625 U	TopTaq-DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Dauer	x 33
Denaturierung	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	45 s	
Annealing	67°C	40 s	
Elongation	72°C	90 s	
Elongation	72°C	10 min	

Zur Untersuchung von Syndapin I (+/+)- sowie Syndapin I (-/-)-Tieren erfolgte die PCR unter nachfolgend aufgelisteten Bedingungen:

25 µl-PCR-Ansatz:

3,0 µl Lysat
0,2 mM dNTP-Mischung
0,2 µM Vorwärtsprimer
0,2 µM Rückwärtsprimer
2,5 µl 10x PCR-Puffer
0,625 U TopTaq-DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Dauer	x 35
Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	45 s	
Annealing	60°C	45 s	
Elongation	72°C	1 min	
Elongation	72°C	10 min	

Die folgenden Tabellen 8 und 9 zeigen die Bestimmung der Genotypen entsprechend der amplifizierten PCR-Produkte.

Tabelle 8: Genotypisierung von Abp1 (+/+)- und Abp1 (-/-)-Mäusen

PCR	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	PCR-Produkt
WT + / +	BQ 675	BQ 676	611 bp
KO - / -	BQ 673	BQ 674	234 bp

Legende:

KO *knockout*, WT Wildtyp.

Tabelle 9: Genotypisierung von Syndapin I (+/+)- und Syndapin I (-/-)-Mäusen

PCR	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	PCR-Produkt
WT + / +	BQ 502	BQ 497	355 bp
KO - / -	BQ 498	BQ 536	227 bp

Legende:

KO *knockout*, WT Wildtyp.

6.2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Charakterisierung der PCR-Produkte

Für die elektrophoretische Analyse der PCR-Produkte wurde ein 1,5%-Agarose-Gel in TAE-Puffer mit Zusatz von 5 µl Ethidiumbromidlösung pro 100 µl Gel vorbereitet. Eine analytische Probe der PCR-Produkte wurde mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einer horizontalen Kammer bei 100 V für 45 min. Um die Größe der aufgetrennten PCR-Produkte abschätzen zu können, wurden 10 µl eines Nukleinsäurestandards (*FastRuler™ DNA Ladder Low Range*, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) mitgeführt. Nach der Elektrophorese erfolgte die Detektion der DNA-Proben unter UV-Licht. Entsprechend der verwendeten *Templates* und *Primer* konnten DNA-Fragmente spezifischer Länge beobachtet

werden, welche entsprechend den Tabellen 8 und 9 Rückschlüsse auf den Genotyp der zu untersuchenden Mäuse zuließen.

- TAE-Puffer 0,114% (v/v) konzentrierte Essigsäure, 1 mM EDTA, 0,04 M Tris-HCL (pH 7.6)
- Ethidiumbromidlösung 1% (w/v) Ethidiumbromid in TAE-Puffer
- 6x DNA-Probenpuffer 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol, 30% Glycerin, 50 mM EDTA

6.3 Proteinbiochemische Methoden

6.3.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse von Proteinen erfolgte nach Laemmli (1970) in einem vertikalen SDS-Polyacrylamidgel, welches sich aus Sammelgel (5%) und Trenngel (6% bzw. 9,5%) entsprechend Tabelle 10 zusammensetzte und von Elektrophorese-Puffer umgeben wurde.

Tabelle 10: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels

Stammlösung	Sammelgel (5%)	Trenngel (6%)	Trenngel (9,5%)
4x Sammelgelpuffer	810 µl	-	-
4x Trenngelpuffer	-	1,25 ml	1,25 ml
Rotiphorese® Gel 30	500 µl	1 ml	1,6 ml
bidestilliertes Wasser	970 µl	2,4 ml	1,8 ml
Glycerin 87% (w/v)	680 µl	350 µl	350 µl
Ammoniumperoxosulfat 10% (w/v)	17,2 µl	33,35 µl	33,35 µl
TEMED (N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin)	2,9 µl	3,35 µl	3,35 µl

Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden diese mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt, wodurch die Denaturierung der Proteine erreicht werden sollte. Das an die Moleküloberfläche gebundene SDS maskierte zusätzlich die Eigenladung der Proteine. Unter Einfluss eines elektrischen Feldes mit der konstanten Spannung von 200 V erfolgte die Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes. Nach circa 1 h hatte die Bromphenolblau-Lauffront das Trenngel durchquert und die Elektrophorese wurde beendet. Der zusätzlich auf das Gel aufgetragene Proteinstandard

(*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) ermöglichte die Bestimmung des Molekulargewichtes der im Gel getrennten Banden.

Im Anschluss an die SDS-PAGE erfolgte entweder eine Coomassie Brilliant Blau-Färbung des Gels (Kapitel 6.3.2) oder die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mittels *Western Blotting* (Kapitel 6.3.3).

- Sammelgelpuffer 0,5 M Tris-HCl (pH 6.8), 0,4% (w/v) SDS
- Trenngelpuffer 1,5 M Tris-HCl (pH 8.8), 0,4% (w/v) SDS
- Elektrophoresepuffer 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
- 4x SDS-Probenpuffer 4% (w/v) SDS, 40% (w/v) Glycerin, 20% (v/v) β -Mercaptoethanol, 250 mM Tris, 0,004% (w/v) Bromphenolblau

6.3.2 Coomassie Brilliant Blau-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau bindet unspezifisch an basische Seitenketten der Aminosäuren und ermöglicht die Proteindetektion in SDS-Polyacrylamidgelen.

Dazu wurde das Trenngel für 45 min auf einem Wippschüttler mit Färbelösung inkubiert. Das Entfärben des Hintergrundes mittels Entfärbelösung erfolgte über Nacht. Nach dem Waschen mit bidestilliertem Wasser wurde das entfärbte Gel für 30 min zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet.

- Färbelösung 1 mg/ml Coomassie Brilliant Blau R250, 60% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
- Entfärbelösung 7% (v/v) Essigsäure, 5% (v/v) Methanol

6.3.3 Western Blotting

Für eine spezifische Proteindetektion war es notwendig, die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels *Semi-Dry-Blot*-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen. Für das *Semi-Dry-Blotting* wurden zwei dicke Filterpapiere sowie eine Nitrocellulosemembran in Transferpuffer getaucht. Die Membran wurde auf einem Filterpapier auf die Anodenseite der horizontalen Blot-Apparatur platziert. Darauf folgten das Gel sowie ein weiteres Filterpapier auf der Seite der Kathode. Der Transfer der negativ geladenen Proteine auf die Membran wurde durch Anlegen einer konstanten Spannung von 200 V für 40 min bewirkt.

- Transferpuffer 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol

6.3.4 Ponceau S-Färbung

Nach dem *Western Blotting* konnte mithilfe der reversiblen Ponceau S-Färbung überprüft werden, ob eine Proteinübertragung auf die Blotmembran stattgefunden hat. Der Blot wurde zunächst dreimal in *Aqua bidest.* geschwenkt und inkubierte im Anschluss daran 10 min mit Ponceau S-Färbelösung. Die Entfärbung erfolgte in *Aqua bidest.* unter Schütteln.

- Ponceau S-Färbelösung 1% (w/v) Ponceau S, 3% Essigsäure

6.3.5 Western Blot-Analyse

Nach erfolgreichem Proteintransfer wurde die Nitrocellulosemembran für 1 h unter Schütteln mit Blotto* inkubiert, um noch freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit PBS-T für je 10 min. Die Blotmembran wurde dann mit dem jeweiligen Primärantikörper, der in PBS-T mit 5% BSA und 0,025% Natriumazid verdünnt war, auf dem Wippschüttler bei 4°C über Nacht inkubiert. Daran schloss sich zur Entfernung ungebundener Primärantikörper ein dreifacher Waschschrift mit Blotto an. Der Peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper wurde in Blotto* verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur mit der Blotmembran inkubiert. Die Nitrocellulosemembran wurde erneut für 10 min mit Blotto sowie dreimal für je 5 min mit PBS-T gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte die Detektion nach Zugabe von ECL-Lösung (Pierce® *ECL Western Blotting Substrate*). Während einer Belichtungszeit zwischen 8 und 20 min wurde das Signal mit dem Chemolumineszenz *Imager* CHEMOCAM HR16 (Intas *Science Imaging Instruments* GmbH, Göttingen) aufgenommen.

- PBS 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,06 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄ (pH 7.4)
- PBS-T 0,05% (v/v) Tween® 20 in PBS
- Blotto 5% (w/v) Milchpulver in PBS-T
- Blotto* 5% (w/v) Milchpulver, 1% (w/v) BSA in PBS-T

6.3.6 Affinitätsaufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Für die Aufreinigung eines rekombinanten GST-Fusionsproteins wurden 100 ml LB-Medium mit Ampicillin mit einer Einzelkolonie von transformierten *E. coli* BL21 (Kapitel 6.2.1) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 300 Upm inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 1 l 2YT-Medium mit Ampicillin überführt und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,8 bei 600 nm unter den gleichen Bedingungen vermehrt. Die Expression des Fusionsproteins

wurde durch Zugabe von IPTG (finale Konzentration 0,5 mM) und anschließende Inkubation für 4 h bei 37°C und 300 Upm induziert. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen (10 min, 2.000 x g) wurde das Sediment in 25 ml PBS mit 1/2 Tablette *Protease Inhibitor Cocktail complete* resuspendiert und über Nacht bei -80°C gelagert. Die sich anschließende Proteinaufreinigung aus der aufgetauten Bakteriensuspension erfolgte bei 4°C. Nach Zugabe von 100 mg Lysozym und 1,4-Dithiothreitol (final 1 mM) wurden die Bakterienzellen mithilfe eines Ultraschallhomogenisators zunächst für 5 min und im Anschluss daran für weitere 3 min aufgeschlossen. Die dreißigminütige Inkubation mit 1% Triton X-100, 2 mg DNase I und 10 mM Magnesiumchlorid diente der weiteren Lyse der Bakterienzellen. Durch zehnminütige Zentrifugation bei 12.000 x g wurden unlösliche Zellbruchstücke von der löslichen Fraktion abgetrennt. Der Überstand wurde 45 min mit 1 ml einer Glutathion-Affinitätsmatrix (*High-Affinity GST Resin*), die zuvor zweimal mit kaltem PBS äquilibriert worden war, inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Matrix für 5 min bei 173 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit jeweils 45 ml kaltem PBS erfolgte die Übertragung der Glutathion-Affinitätsmatrix und des daran gebundenen GST-Fusionsproteins auf eine Säule. Das Fusionsprotein wurde mehrmals durch Zugabe von GST-Elutionspuffer und eine zehnminütige Inkubationszeit eluiert. Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis die qualitative Bradford-Analyse (Kapitel 6.3.8) der Eluate eine deutliche Abnahme der Blaufärbung und damit eine Verringerung des Proteingehalts anzeigte. Die Fraktionen mit dem größten Proteingehalt wurden vereinigt und über Nacht bei 4°C gegen 2 l PBS dialysiert. Die Analyse des aufgereinigten GST-Fusionsproteins erfolgte mittels SDS-PAGE (Kapitel 6.3.1) und anschließender Coomassie Brilliant Blau-Färbung (Kapitel 6.3.2) sowie durch die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Kapitel 6.3.8). Aufgereinigtes Protein wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

- 2YT-Medium 31 g 2-YT-Broth auf 1 l H₂O
- GST-Elutionspuffer 20 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl (pH 8.0)

6.3.7 Affinitätsaufreinigung von Antikörpern gegen His₆-TRX-Cobl 175-324 Δ262-286

Zunächst wurde eine präparative SDS-PAGE mit 300 µg des Antigens durchgeführt. Nach dem Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran mittels Western Blot (*Semi-Dry*) konnte die Proteinbande durch Ponceau S-Färbung sichtbar gemacht, ausgeschnitten und zerkleinert werden. Während einer dreißigminütigen Inkubation der Membranfragmente mit 1% BSA in

PBS-T wurden unspezifische Proteinbindestellen blockiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit 0,1% BSA in PBS-T. Das an die Membranfragmente gebundene Antigen wurde mit 2 ml Serum über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Abnehmen des depletierten Serums wurde erneut dreimal mit 0,1% BSA in PBS-T gewaschen. Mit je 300 µl Elutionspuffer wurden die gebundenen Antikörper in drei aufeinander folgenden Schritten für 90 s eluiert, die Eluate sofort mit jeweils 15,75 µl Na₂HPO₄ versetzt und vereinigt.

Aufgereinigte Antikörper wurden bei -80°C bzw. in 50% Glycerin bei -20°C gelagert. Die Charakterisierung der aufgereinigten Antikörper erfolgte durch Western Blot-Analyse.

- Elutionspuffer 5 mM Glycin-HCl (pH 2.3), 500 mM NaCl, 0, 5% (v/v) Tween® 20, 100 µg/µl BSA (pH 2.3, steril filtriert)

6.3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976) wurde zunächst eine BSA-Standardreihe von 0 bis 20 µg BSA in 150 mM NaCl (Endvolumen 100 µl) erstellt. Von der proteinhaltigen Probe wurde 1 µl abgenommen und ebenfalls mit 150 mM NaCl auf 100 µl verdünnt. Nach Zugabe von 1 ml Bradford-Lösung inkubierten alle Ansätze für 2 min bei Raumtemperatur. Es erfolgte die Bestimmung der Absorbanzen bei 595 nm und eine Standardkurve für BSA wurde erstellt. Mithilfe der Standardreihe konnte die Konzentration der zu quantifizierenden Proteinprobe entsprechend deren Absorbanz ermittelt werden.

- Bradford-Lösung 100 mg/l Coomassie Brilliant Blau R-250, 5% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Phosphorsäure (85%), filtriert

6.4 Zellkultur-Methoden und Immuncytochemie

6.4.1 Zelllinien

6.4.1.1 Transfektion von HEK293-Zellen und Erstellung von HEK293-Zell-Lysaten

HEK293-Zellen einer konfluent bewachsenen 75cm²-Zellkulturflasche wurden in die Vertiefungen einer 6-Well-Platte subkultiviert. Dazu erfolgte zunächst die Resuspension der Zellen in 10 ml DMEM komplett. Die Zellsuspension wurde im Anschluss daran mit DMEM

komplett 1:2 verdünnt und mit 1,5 ml pro Vertiefung auf die Zellkulturplatten aufgetragen. Bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% inkubierten die ausgesäten HEK293-Zellen.

Einen Tag nach der Passagierung wurden die Zellen mithilfe des kationischen Lipidreagenzes Lipofectamin™ LTX transfiziert. Für jede Vertiefung der 6-Well-Platte wurde eine Lösung aus 1,5 µg Plasmid-DNA, 100 µl Opti-MEM und 6 µl Plus-Reagenz hergestellt. Dieser Ansatz inkubierte 15 min bei Raumtemperatur und wurde schließlich mit einer weiteren Lösung aus 100 µl Opti-MEM und 4 µl Lipofectamin™ LTX vereinigt. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 30 min wurde die gesamte Lösung mit den darin enthaltenen Komplexen aus DNA und kationischen Lipiden zu den Zellen gegeben und für 3 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM komplett.

24 h nach der Transfektion führte die Zugabe von 6 mM Natriumbutyrat zur Steigerung der Proteinbiosynthese. Weitere 24 h später wurde zunächst das Expressionsniveau der EGFP-Fusionsproteine mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops überprüft. Die HEK293-Zellen wurden mit gekühltem PBS-CM gewaschen, anschließend in PBS resuspendiert und durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 1.000 x g und 4°C sedimentiert. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 265 µl IP-Puffer zu den Zellen je einer Plattenvertiefung während der folgenden Inkubationszeit von 20 min bei 4°C. Im Anschluss wurden unlösliche Zellbestandteile bei 20.800 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde nach kurzem Aufkochen (95°C, 5 min) mit 1x SDS-Probenpuffer bei -20°C gelagert und für spätere Western Blot-Analysen verwendet.

- DMEM komplett 10% Fötales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin in DMEM
- PBS-CM 0,5 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂ in PBS (pH 7.4)
- IP-Puffer 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 0,1 mM MgCl₂, 100 mM NaCl,
1% (v/v) Triton X-100, 1x *Protease Inhibitor Cocktail complete* (pH 7.5)

6.4.1.2 Subkultivierung, Transfektion und Immunfluoreszenzfärbung von COS-7-Zellen

In die Vertiefungen einer 24-Well-Platte wurde je ein Deckglas übertragen. Nach Zugabe von 500 µl Poly-D-Lysin inkubierten die Deckgläser 1 h bei Raumtemperatur. Das Poly-D-Lysin wurde entfernt und es folgte ein dreimaliges Waschen mit HBSS.

Die COS-7-Zellen einer konfluent bewachsenen 75cm²-Zellkulturflasche wurden zunächst mit 10 ml HBSS gewaschen. Durch anschließende fünfminütige Inkubation (37°C, 5% CO₂) mit 1 ml Trypsin-Lösung wurden die Zellen von der Wand des Plastikgefäßes gelöst und anschließend in 10 ml DMEM komplett aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit

DMEM komplett 1:12 verdünnt, zu je 500 µl auf die Deckgläschen in einer 24-Well-Platte pipettiert und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Nach 24 h erfolgte die Transfektion von Plasmid-DNA in COS-7-Zellen mittels Lipofectamin™ LTX. Dazu inkubierten zunächst jeweils 0,7 µg Plasmid-DNA mit 50 µl Opti-MEM sowie 3 µl Plus-Reagenz für 15 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe einer zweiten Lösung aus 50 µl Opti-MEM und 2 µl Lipofectamin™ LTX sowie einer weiteren Inkubationszeit von 30 min wurde der gesamte Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben. 3 h nach Beginn der Transfektion erhielten die Zellen einen Mediumwechsel mit DMEM komplett.

48 h nach der Transfektion erfolgte die Fixierung und immuncytochemische Färbung der an Deckgläschen adhärenen COS-7-Zellen bei Raumtemperatur. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 500 µl vorgewärmtem PBS-CM gewaschen und im Anschluss daran 7 min mit 500 µl 4% PFA fixiert. Zur Inaktivierung des Paraformaldehyds folgte eine dreißigminütige Inkubationszeit mit 500 µl Quenchpuffer pro Deckgläschen. Mittels 500 µl Blocklösung mit 0,02 mg/ml Saponin sollte im Verlauf der folgenden 60 min sowohl die Permeabilisierung der Zellmembran als auch die Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen erreicht werden. Die Deckgläschen wurden schließlich mit der Zellseite nach unten auf einen 25 µl-Tropfen der Primärantikörper-Verdünnung in Blocklösung gelegt und inkubierten 1 h in der feuchten Kammer. Nach dem Rücktransfer der Deckgläschen in die 24-Well-Platte erfolgte darin das dreimalige Waschen der Zellen mit je 200 µl Blocklösung, um Reste ungebundener Primärantikörper zu entfernen. Die mit fluoreszierenden Alexa Fluor™-Farbstoffen gekoppelten sekundären Antikörper wurden ebenfalls in Blocklösung verdünnt und die COS-7-Zellen auf 25 µl-Tropfen dieser Sekundärantikörper-Verdünnung für 1 h inkubiert. Es folgten der Transfer der Deckgläschen in die 24-Well-Platte sowie weitere Waschschrte mit 200 µl Blocklösung und 500 µl PBS. Nach kurzem Schwenken in bidestilliertem Wasser wurden Flüssigkeitsreste mit einem Papiertuch abgesaugt. Das Eindecken der COS-7-Zellen mittels 5 µl Mowiol je Deckglas erfolgte mit der Zellseite zum Objektträger hin.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte unter Verwendung des aufrechten Mikroskopes Axio *Imager*.D1. Fotografische Aufnahmen wurden mithilfe einer CCD-Kamera sowie der SPOT-*Advanced*-Software erstellt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop CS4 *Extended* (Adobe Systems Inc., San José, USA).

- | | |
|------------------|---|
| • Poly-D-Lysin | 100 mg/l Poly-D-Lysin, 100 mM Borsäure (pH 8,5, steril filtriert) |
| • Trypsin-Lösung | 0,5% Trypsin-EDTA (10x) 1:10 in HBSS (ohne Phenolrot, ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺) |
| • 4% PFA | 4% Paraformaldehyd in PBS (pH 7.4) |
| • Quenchpuffer | 25 mM Glycin in PBS (pH 7.4) |

- Blocklösung 2% (w/v) BSA, 10% (v/v) Pferdeserum in PBS (pH 7.4)
- Mowiol 10% (w/v) Mowiol 4-88, 25% (w/v) Glycerin, 100 mM Tris-HCl (pH 8.5)

6.4.2 Primäre Neuronen

6.4.2.1 Präparation primärer Neuronen

Die für die Aussaat von primären Neuronen bestimmten Deckgläser wurden spezifisch vorbereitet. In einer Petrischale erfolgte das mehrmalige Waschen für jeweils 10 min bei Raumtemperatur nach folgendem Schema:

1x	10% (w/v) SDS
2x	bidestilliertes Wasser
1x	70% Ethanol
1x	100% Ethanol
1x	bidestilliertes Wasser

Im Anschluss daran trockneten die Deckgläschen auf einem Papiertuch und wurden in die Vertiefungen einer 24-Well-Platte transferiert. Mit 300 µl einer zugegebenen Poly-D-Lysin-Lösung pro Well wurden die Deckgläschen über Nacht bei 37°C beschichtet. Am darauffolgenden Tag erfolgte das Absaugen der Poly-D-Lysin-Lösung sowie das einstündige Trocknen der Deckgläschen, bevor die präparierten primären Neuronen ausgesät wurden. Vorbereitete trockene Deckgläschen konnten bei 4°C gelagert werden. In diesem Falle wurden sie vor Aussaat der Zellen erneut dreimal mit *Aqua bidest.* gewaschen sowie unter UV-Licht getrocknet.

Die Entnahme primärer Neuronen aus Rattenembryonen (*Rattus norvegicus*, Wistar-Stamm) erfolgte durch Annett Kreusch und Dirk Schlobinski am 18. Tag nach Verpaarung der Elterntiere. Die trächtige Ratte wurde zunächst in einem großen verschließbaren Becherglas mit 2-Bromo-2-Chloro-1,1,1-trifluoroethan-gesättigter Luft narkotisiert. Nach Ausbleiben der Atmung erfolgte die Dekapitierung der Ratte und die im Uterus befindlichen Embryonen konnten freigelegt werden. Auch diese wurden dekapitiert. An die Präparation der embryonalen Hippocampi bzw. des Cortex-Gewebes schloss sich deren fünfminütiges Waschen mit kaltem HBSS (mit Phenolrot) an. Es folgte die Inkubation mit 5 ml vorgewärmter Trypsin-Lösung* für 15 min bei 37°C. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit vorgewärmtem HBSS (mit Phenolrot) wurde das HBSS durch 2 ml Neurobasal* ersetzt. Mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer Pasteur-Pipette sollte schließlich zur Vereinzelung der Zellen führen. Die Zellsuspension wurden steril filtriert und mit Neurobasal* auf 5 ml aufgefüllt. Nach Bestimmung der Zellzahl mithilfe einer Zählkammer erfolgte die weitere

Verdünnung der Zellsuspension auf final 60.000 Zellen je 100 µl. Von dieser Lösung wurden jeweils 100 µl auf die vorbereiteten Deckgläschen in den Vertiefungen einer 24-Well-Platte ausgesät (531 Zellen pro mm²) und inkubierten 2 h bei 37°C. Schließlich wurden zu jedem Deckgläschen 500 µl Neurobasal* gegeben.

Die auf den Deckgläschen adhärennten primären Neuronen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am 3., 7. sowie 10 Tag nach Aussaat der Zellen erfolgte ein Mediumwechsel, wobei jeweils 300 µl des Mediums durch Neurobasal** ersetzt wurden.

- Trypsin-Lösung* 0,5% Trypsin-EDTA (10x) 1:10 in HBSS (mit Phenolrot, ohne Ca²⁺/Mg²⁺)
- Neurobasal* B27 (50x) 1:50, 500 µM L-Glutamin, 25 µM L-Glutamat in Neurobasal™ Medium
- Neurobasal** B27 (50x) 1:50, 500 µM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin in Neurobasal™ Medium

6.4.2.2 Transfektion und Fixierung primärer hippocampaler Neuronen

Nach 10 Tagen *in vitro* erfolgte die Transfektion von Plasmid-DNA in primäre hippocampale Neuronen mithilfe von Lipofectamin™ 2000. Dafür wurde zunächst das Medium abgenommen und durch 1 ml Neurobasal*** ersetzt. Es wurde für jedes Deckgläschen eine Lösung aus je 1 µg zu transfizierender Plasmid-DNA und 50 µl Opti-MEM erstellt. Eine zweite Lösung aus 50 µl Opti-MEM und 1 µl des kationischen Lipidreagenzes Lipofectamin™ 2000 inkubierte zunächst für 5 min bei Raumtemperatur und wurde schließlich mit der ersten Lösung vereint. Nach weiterer zwanzigminütiger Inkubationszeit zur Ausbildung von Komplexen aus kationischen Lipiden und DNA wurde der komplette Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben. Die primären Neuronen inkubierten damit für 4 h bei 37°C und 5% CO₂. Bei dem anschließenden Mediumwechsels wurde eine Mischung aus 300 µl Neurobasal** sowie 300 µl des vor der Transfektion abgenommenen Mediums zu den Neuronen gegeben.

48 h nach der Transfektion erfolgten die Fixierung der hippocampalen Neuronen mit 4% PFA (10 min bei Raumtemperatur) sowie die anschließende dreißigminütige Inkubation mit Quencherpuffer. An dieser Stelle schlossen sich ein dreifacher Waschschritt mit PBS und das Eindecken der Deckgläschen mithilfe von Mowiol an, wobei die Zellseite zum Objektträger gerichtet wurde.

- Neurobasal*** B27 (50x) 1:50, 500 µM L-Glutamin in Neurobasal™ Medium

6.4.2.3 Immunfluoreszenzfärbung von primären Neuronen

Die *in vitro*-Immunlokalisation sowohl endogener als auch überexprimierter Proteine erfolgte nach 5 bzw. 21 Tagen in Kultur und wurde analog zur immunocytochemischen Färbung von COS-7-Zellen durchgeführt (Kapitel 6.4.1.2). Anstatt der Standardfixierung mittels 4% Paraformaldehyd wurde in einzelnen Experimenten eine zehnminütige Fixierung mit eiskaltem Methanol (100%) und anschließendem dreifachem Waschen mit PBS für jeweils 5 min durchgeführt. Die sich anschließenden Arbeitsschritte erfolgten wie in Kapitel 6.4.1.2 beschrieben. Es wurden die in Kapitel 6.1.6 gelisteten Antikörper bzw. Alexa Fluor™ 488-gekoppeltes Phalloidin (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) zur Darstellung von F-Aktin eingesetzt.

6.4.2.4 Fluoreszenzmikroskopie und quantitative Analyse der dendritischen *spines*

Mithilfe des aufrechten Mikroskopes Axio *Imager.D1* (Zeiss) wurden die Zellen analysiert und unter Verwendung einer CCD-Kamera sowie der SPOT-*Advanced*-Software fotografiert. Die weitere Bildbearbeitung sowie die Analyse der dendritischen *spines* erfolgten unter Verwendung von Image J (Rasband, W. S., *U. S. National Institutes of Health*, Bethesda, USA) und Adobe Photoshop CS4 *Extended* (Adobe Systems Inc., San José, USA).

Transfizierte Zellen wurden über das EGFP-Signal identifiziert. Die morphologische Analyse der Neuronen erfolgte mithilfe des Signals der koexprimierten, zur Plasmamembran lokalisierenden RFP-Variante pMCherry-F. Zunächst wurden die Dendritenabschnitte fotografiert und quantitativ ausgewertet. Die Längen und gegebenenfalls Kopfweiten (lotrecht zur maximalen *spine*-Länge) der dendritischen Dornfortsätze wurden bestimmt und deren Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Auf der Grundlage dieser Messungen erfolgte die Zuordnung der *spines* zu einer morphologischen Klasse (Abb. 7), sodass schließlich deren relativer Anteil an der Gesamtzahl bestimmt werden konnte.

Die *spine*-Dichte je 10 µm Dendrit ergab sich aus der absoluten Anzahl an dendritischen Dornfortsätzen und wurde zunächst für jeden einzelnen Dendritenabschnitt bestimmt. Aus diesen Werten erfolgte die Berechnung des Mittelwertes unter Angabe des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM). Die weitere statistische Auswertung für Längen und Dichten erfolgte unter Anwendung des zweiseitigen t-Tests. Über die ermittelten p-Werte konnten Aussagen zur Signifikanz der Ergebnisse im Vergleich zu den Kontrollzellen getroffen werden. (***) $p < 0,001$; ** $0,001 \leq p < 0,01$; * $0,01 \leq p < 0,05$).

Insgesamt wurden für jedes Konstrukt 431 bis 1.100 *spines* aus sechs voneinander unabhängigen Neuronen-Präparationen untersucht.

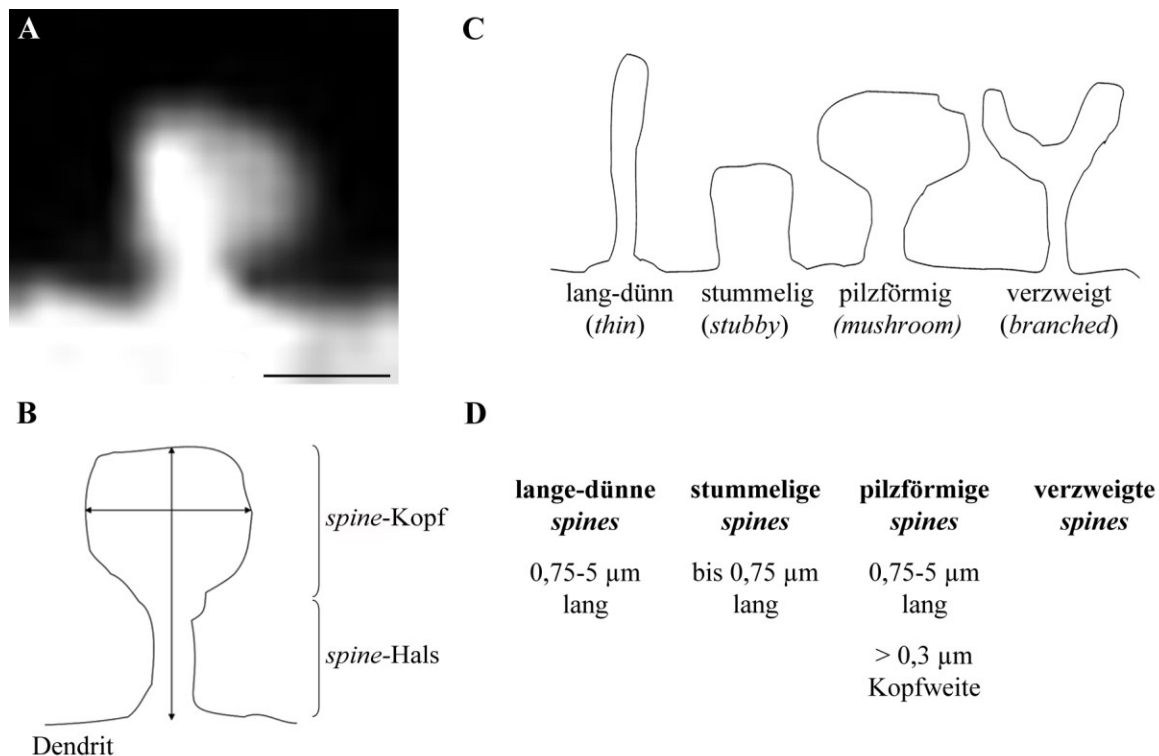


Abb. 7: Morphologische Analyse der dendritischen *spines*.

Das Fluoreszenzsignal der *spines* transfizierter Neuronen (A) wird ausgewertet, in dem die *spine*-Gesamtlänge sowie gegebenenfalls die Kopfweite gemessen werden (B). Entsprechend der Kriterien in D werden die *spines* morphologischen Klassen (C) zugeordnet. Der Balken in A entspricht 1 µm.

6.4.3 Organotypische Schnittkulturen (Kleinhirn)

6.4.3.1 Herstellung von Kleinhirnschnittkulturen und Transfektion mittels *Gene Gun*

Die Herstellung und Transfektion cerebellärer Schnittkulturen erfolgten mit Unterstützung der dem Leibniz-Institut für Altersforschung - Fritz-Lipmann-Institut e.V. (FLI) zugehörigen Arbeitsgruppe um Dr. Heike Heuer, die freundlicherweise sowohl technische Ausstattung als auch junge NMRI-Mäuse zur Verfügung stellten.

Zur Herstellung der Schnittkulturen wurden 10 Tage junge Mäuse aus vier unabhängigen Würfen dekapitiert, das Kleinhirn präpariert und mithilfe eines *Tissue-Chopper* 200 µm dünne parasagittale Schnitte angefertigt. Nach deren Separation unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskopes wurden jeweils 4 bis 6 der Schnitte auf die Filtermembran eines Millicell-CM Zellkultureinsatzes (0,4 µm Porendurchmesser) transferiert, welcher sich auf 1,2 ml Neurobasal** in je einer Vertiefung einer 6-Well-Platte befand.

Im Anschluss an eine zweistündige Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte die Transfektion der Kleinhirnschnitte mithilfe des Helios® *Gene Gun*-Systems. Entsprechend der Herstellerangaben wurden 24 µg der Plasmid-DNA zunächst an 12 mg Gold-Partikel

(1 µm Durchmesser je) präzipitiert und zur Beschichtung der Innenseite eines Schlauchstücks verwendet. Etwa 10 mm kurze, beschichtete Schlauchabschnitte dienten als Patronen für jeweils einen Schuss, bei dem die DNA-Gold-Partikel mittels Überdruck (Helium, 10,3 bar) auf die Schnitte einer Plattenvertiefung beschleunigt wurden. Die Kulturen inkubierten in Anschluss daran bei 37°C und 5% CO₂.

6.4.3.2 Fixierung und Färbung der transfizierten Kleinhirnschnittkulturen

Etwa 42 h nach Transfektion wurden die auf der Filtermembran adhärennten transfizierten Kleinhirnschnitte für 1,5 h mit 4% PFA fixiert, aus dem Filtereinsatz herausgeschnitten und in je eine mit PBS gefüllte Vertiefung einer 24-Well-Platte transferiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS (je 5 min) erfolgte die einstündige Blockierung in *Gene Gun*-Blocklösung. Um eine Verstärkung des EGFP-Signals der erfolgreich mit Cobl-RNAi transfizierten Zellen zu erreichen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung des EGFP (anti-GFP (rb), 1:500) in *Gene Gun*-Blocklösung* bei 4°C über Nacht durchgeführt. An das Waschen mit PBS (zweimal, je 5 min) schloss sich die zweistündige Inkubation des Alexa Fluor™ 488-markierten anti-Kaninchen-Sekundärantikörpers an, welcher 1:1000 in *Gene Gun*-Blocklösung* verdünnt wurde. Nach weiterem Waschen mit PBS (zweimal, je 5 min) folgten das Eindecken der Präparate mit Fluoromont-G™ sowie deren Abdichtung mittels handelsüblichen Nagellacks.

- *Gene Gun*-Blocklösung 10% (v/v) Ziegen Serum, 0,2% (v/v) Triton X-100 in PBS
- *Gene Gun*-Blocklösung* 1% (v/v) Ziegen Serum, 0,2% (v/v) Triton X-100 in PBS
- Neurobasal**

6.4.3.3 Quantitative Auswertung morphologischer Parameter der Purkinje-Zellen

Cerebelläre Purkinje-Zellen mit intaktem Dendritenbaum und klarer Abgrenzung zu benachbarten Zellen wurden mithilfe des Mikroskopes Axio *Imager*.D1 (Zeiss), einer CCD-Kamera sowie der SPOT-*Advanced*-Software fotografiert. Die parasagittale Schnittführung während der Präparation und der sich in einer Ebene erstreckende Dendritenbaum der Purkinje-Zellen ermöglichten dabei die nahezu vollständige Erfassung einer Zelle in einer Ebene. Quantitative morphologische Analysen erfolgten unter Verwendung von Image J (Rasband, W. S., *U. S. National Institutes of Health*, Bethesda, USA). Es wurden die Fläche des Dendritenbaumes sowie die maximale Ausdehnung jeder Purkinje-Zelle, das heißt der Abstand zwischen Mittelpunkt des Somas und der Spitze des am weitesten ausgedehnten Dendriten, bestimmt, für alle Zellen gemittelt und mit der Standardabweichung angegeben. Die Auszählung aller Verzweigungspunkte (Verzweigungen mit einer Länge von mehr als 7

µm) sowie die Berechnung des Verzweigungsgrades in Bezug auf die Fläche erfolgten zunächst für jede Zelle einzeln, wobei die Ergebnisse gemittelt und mit dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben wurden. Alle Daten wurden in einem zweiseitigen, ungepaarten t-Test gegen die Kontrolle getestet.

6.5 Immunhistochemische Methoden

6.5.1 Fixierung und Präparation muriner Organe

Die Fixierung und Präparation verschiedener Organe der Maus (*Mus musculus*) wurde am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Arbeitsgruppe Hübner) mit Unterstützung von Dr. Antje-Kathrin Hübner durchgeführt. Zur Analyse von *in situ*-Immunlokalisationen wurden verschiedene Tiere aus der eigenen Zucht untersucht. Immunhistochemische Färbungen erfolgten dabei jeweils an Gewebeschnitten aus mindestens drei unterschiedlichen Organismen.

Zu präparierende Mäuse wurden durch abdominale Injektion von 300 µl Narkose-Ansatz betäubt. Sobald die mittels Kneiftest überprüften Schmerzreflexe erloschen waren, erfolgte die Entnahme einer Schwanzspitzenbiopsie zur Überprüfung des Genotyps. Das Fell wurde in der ventralen Mittellinie aufgetrennt. Das Ablösen des Zwerchfells vom Rippenbogen sowie die Entfernung von Sternum und ventralen Rippenabschnitten führten zur Freilegung des noch schlagenden Herzens. Nach Punktion der linken Herzkammer und des rechten Vorhofs konnte das Blutgefäßsystem mit PBS gespült werden. Sobald das gesamte Blut ausgespült war und nur noch eine klare Flüssigkeit aus dem linken Herzvorhof ausströmte, wurden die Tiere mit jeweils 50 ml 4% PFA perfundiert, was zur schnellen und effizienten Fixierung der Organe vom Blutgefäßsystem her führte. An die Präparation der zu untersuchenden Gewebe (Gehirn, Lunge, Hoden, Milz, Bauchspeicheldrüse) schloss sich deren Nachfixierung durch Inkubation in 4% PFA bei 4°C über Nacht an. Die Gewebe wurden am darauffolgenden Tag mit PBS und Leitungswasser gewaschen und in PBS mit 0,02% Natriumazid bei 4°C gelagert. In Vorbereitung auf die Anfertigung von Kryoschnitten inkubierten die Organe solange in einer 30%igen Sucrose-Lösung, bis sie darin abgesunken waren.

- Narkose-Ansatz 2 ml Ketaminhydrochlorid (50 mg/ml), 0,7 ml Rompun (2%-Injektionslösung), 5,6 ml NaCl
- 30%-Sucrose-Lösung 30% (w/v) Sucrose in PBS

6.5.2 Anfertigung und immunhistochemische Färbung von 55 µm-Gehirnschnitten

Die Anfertigung sagittaler Gehirnschnitte erfolgte unter Verwendung des Schlittenmikrotoms SM 2000R. Dazu wurde je eine Hemisphäre mit 5%iger Sucrose-Lösung auf dem durch Trockeneis gekühlten Objektisch festgefroren. Die angefertigten 55 µm dicken Schnitte wurden mit einem Pinsel abgenommen und in die Vertiefungen einer 24-Well-Platte transferiert, welche zuvor mit je 1 ml PB mit 0,02% Natriumazid gefüllt worden waren.

Zu färbende Schnitte konnten daraus mit einem Pinsel ausgewählt und in weitere Vertiefungen einer 24-Well-Platte übertragen werden. Nach zweimaligem Schwenken für je 5 s PB wurde dieses durch Histo-Blocklösung ersetzt, in welcher die Schnitte für 2 h inkubierten. Dieser Inkubationsschritt hatte zum einen die Permeabilisierung der Zellmembranen und zum anderen die Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen zu Ziel. Der Primärantikörper wurde pro Vertiefung in 300 µl Histo-Blocklösung verdünnt und mit den jeweiligen Schnitten für 48 h bei 4°C inkubiert. An das dreimalige Waschen mit PB schloss sich die Übernacht-Inkubation der Schnitte bei 4°C in 300 µl einer Verdünnung des Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpers in Histo-Blocklösung an. Es wurde erneut mit PB gewaschen. Zur Darstellung der Zellkerne inkubierte eine Lösung von DAPI (Carl Roth, Karlsruhe) in PB (1:1.000) für 30 min mit den Gewebeproben. Die immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitte wurden in PBS übertragen, mithilfe eines Pinsels auf Adhäsionsobjektträger HistoBond® aufgezogen und schließlich mit Fluoromont-G™ eingedeckt. Nach circa 1 h wurden die Schnittpräparate mit handelsüblichem Nagellack abgedichtet.

- PB 77,4 mM Na₂HPO₄, 22,6 mM NaH₂PO₄
- 5%-Sucrose-Lösung 5% (w/v) Sucrose in PBS
- Histo-Blocklösung 5% (v/v) Ziegenserum, 0,25% (v/v) Triton X-100 in PB

6.5.3 Anfertigung und immunhistochemische Färbung von 8 µm-Gewebeschnitten

8 µm dünne Schnitte wurden von Gewebeproben aus Bauchspeicheldrüse, Hoden, Lunge und Milz erstellt. Zur Kryoprotektion wurden die Proben zunächst luftblasenfrei mit *Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound* in ein kleines Gefäß (2 cm x 2 cm x 2 cm) eingebettet, auf Trockeneis eingefroren und bei -20°C gelagert. Das Schneiden der entstandenen Blöcke erfolgte mithilfe des Kryostats CM 3050S. Die dünnen Organschnitte wurden durch Berühren mit einem HistoBond® Adhäsionsobjektträger an diesen angeheftet und konnten nach 1 h Trockenzeit bei -20°C gelagert werden.

Vor der eigentlichen immunhistochemischen Färbung erfolgte eine einstündige Inkubation in PBS zum Auswaschen von *Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound* aus den Gewebeprobe. Die folgenden Arbeitsschritte wurden mithilfe der *Shandon Coverplate Cassette* (Thermo Fisher Scientific GmbH, Ort) durchgeführt. Das durch dieses System vermittelte Einspannen der Objektträger zwischen den *Shandon Coverplates* und einer Haltevorrichtung ermöglicht die Benetzung des gesamten Objektträgers mit nur sehr geringen Mengen (250 µl) einer Lösung. Die Gewebeschnitte inkubierten zunächst für 1 h bei Raumtemperatur in Histo-Blocklösung. Der in Histo-Blocklösung verdünnte Primärantikörper wurde für 24 h bei 4°C zu den Schnitten gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PB erfolgte die Zugabe des Alexa Fluor™-gekoppelten Sekundärantikörpers in Histo-Blocklösung (1 h, 4°C). Es schlossen sich die folgenden, bei Raumtemperatur durchgeführten Schritte an: einmaliges Waschen mit PB, 30 min Inkubation mit einer DAPI-Verdünnung (1:1.000) in PB, dreimaliges Waschen mit PB. Die Objektträger mit den adhären Gewebeschnitten wurden nun in einer mit PBS-gefüllten Schale von den *Coverplates* abgeschwemmt und mit Fluoromont-G™ eingedeckt. Nach einstündiger Trockenzeit erfolgte die Abdichtung der Präparate durch handelsüblichen Nagellack.

6.5.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie und Bildbearbeitung

Alle Aufnahmen der immunhistochemisch gefärbten Präparate wurden mithilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopsystems TCS SP5 und des daran gekoppelten inversen Mikroskops DMI6000 erstellt. Unter Verwendung der Objektive HC PL FLUOTAR 10.0 x 0.3 DRY (*Pinhole* 70,72 µm) sowie HCX APO U-V-I 40.0 x 0.75 DRY (*Pinhole* 113,21 µm) wurden die Immunfärbungen sowie dazugehörige Kontrollen unter denselben Bedingungen aufgenommen und im Anschluss daran mittels Adobe Photoshop CS4 *Extended* (Adobe Systems Inc., San José, USA) exakt gleich bearbeitet.

7 ERGEBNISSE

7.1 Aufreinigung und Charakterisierung von polyklonalen anti-Cobl-Antikörpern

7.1.1 Anti-Cobl-Antikörper und alternative Cobl-Spleißvarianten

Studien zur funktionellen Charakterisierung des Aktinnukleators Cobl erfordern geeignete Antikörper zur Detektion des endogenen Proteins. Innerhalb der Arbeitsgruppe waren Antiseren gegen die Epitope Cobl 175-324 Δ 262-286 und Cobl 750-1005 vorhanden, aus denen die spezifischen Antikörper anti-Cobl^{ARA} und anti-Cobl^{DBY} aufgereinigt wurden (Abb. 8). Zur Interpretation der mit den Antikörpern erzielten Ergebnisse ist eine Kenntnis putativer Spleißvarianten von Cobl unerlässlich.

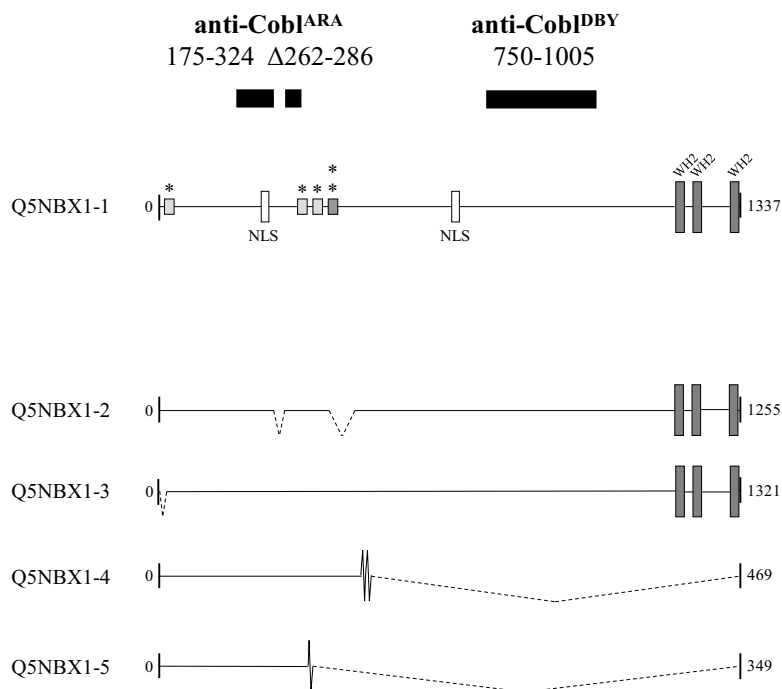


Abb. 8: Cobl-Varianten durch alternatives Spleißen und Epitope der anti-Cobl-Antikörper.

Cobl besitzt zwei putative Kernlokalisierungssignale (NLS) und interagiert über Prolin-reiche Domänen mit Abp1 (*) und Syndapin I (*). Es sind fünf putative Cobl-Spleißvarianten bekannt, von denen zwei als verkürzte Formen (Δ 470-1337 bzw. Δ 350-1337) ohne die Aktin-nukleierenden WH2-Domänen, allerdings mit im Vergleich zu Cobl 1-1337 veränderter Aminosäuresequenz (22 bzw. 5 Aminosäuren) direkt vor der Deletion auftreten. Zwei der drei langen Varianten zeigen Deletionen (Δ 262-268 und Δ 391-448 bzw. Δ 1-16). Die Informationen zu alternativen Cobl-Varianten wurden der UniProtKB/Swiss-Prot-Datenbank (*Accession*: Q5NBX1) entnommen.

Nach aus der UniProtKB/Swiss-Prot-Datenbank entnommenen EST (*expressed sequence tag*)-basierenden Informationen kann Cobl (*Accession*: Q5NBX1) in alternativen Spleißvarianten auftreten (Abb. 8). Während zwei dieser putativen Formen im Vergleich zum

Protein der vollen Länge (Q5NBX-1) Deletionen an den Aminosäurepositionen 262-268 und 391-448 (Q5NBX-2) bzw. 1-16 (Q5NBX-3) tragen, fehlt den Spleißvarianten Q5NBX-4 sowie Q5NBX-5 der komplette Aktin-nukleierende C-Terminus.

7.1.2 Erfolgreiche Aufreinigung von GST-Cobl 175-324

Zur Affinitätsaufreinigung des Cobl-Antikörpers anti-Cobl^{ARA} wurde zunächst das Fusionsprotein GST-Cobl 175-324 rekombinant in *E. coli* exprimiert und mithilfe einer Glutathion-Affinitätsmatrix aufgereinigt. Während der Proteinaufreinigung gewonnene Proben wurden über SDS-PAGE (9,5%iges Trenngel) aufgetrennt und mittels Coomassie Brilliant Blau-Färbung sichtbar gemacht (siehe Abb. 9).

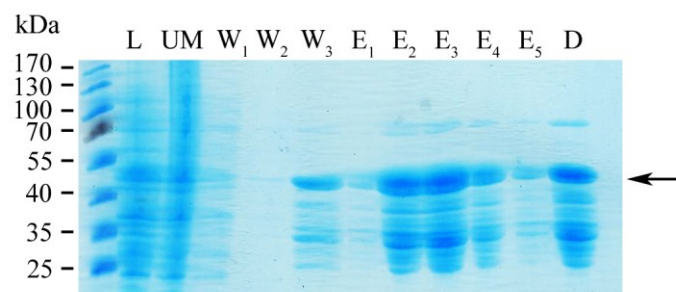


Abb. 9: SDS-PAGE-Analyse der Proteinaufreinigung von GST-Cobl 175-324 mittels Coomassie Brilliant Blau-Färbung.

Der Überstand des Lysats (L), die Elutionsfraktionen E₂, E₃, E₄ sowie das Dialysat (D) enthalten GST-Cobl 175-324 der molaren Masse von 42,3 kDa (Pfeil). L Lysat-Überstand (5 µl), UM ungebundenes Material (5 µl), W Waschfraktion (10 µl), E Elutionsfraktion (2,5 µl), D Dialysat (2,5 µl).

Nach der Lyse der Bakterienzellen sowie Zentrifugation konnte im löslichen Überstand (L) Protein der molaren Masse von etwa 45 kDa nachgewiesen werden. Die zu beobachtenden Banden zeigten damit sehr wahrscheinlich das überexprimierte Fusionsprotein, für das eine molare Masse von 42,3 kDa zu erwarten ist, sowie dessen Abbauprodukte. Das Fusionsprotein band im weiteren Verlauf des Experiments nicht vollständig an die Glutathion-Affinitätsmatrix, denn auch das ungebundene Material (UM) enthält noch sehr große Mengen des Proteins. Ebenso erfolgten Proteinverluste im Waschschrift W₃. In den Elutionsfraktionen E₂ bis E₄ konnte das Protein in hoher Konzentration nachgewiesen werden, weshalb diese vereinigt und über Nacht gegen PBS dialysiert wurden. Dass in diesem Schritt keine relevanten Proteinverluste auftraten, wurde durch der Analyse des Dialysats (D) deutlich. An die erfolgreiche Affinitätsaufreinigung von GST-Cobl 175-324 schloss sich die Konzentrationsbestimmung nach Bradford an, welche mit dem Ergebnis von 7,75 g/l den Erfolg der Proteinaufreinigung mit einer Ausbeute von etwa 11,63 mg Fusionsprotein aus

1,11 Bakterienkultur bestätigte. Die Proteinpräparation wurde anschließend für die Affinitätsaufreinigung von anti-Cobl-Antikörpern verwendet.

Das Fusionsprotein GST-Cobl 750-1005, welches ebenfalls für die folgenden Antikörper-Affinitätsreinigungen benötigt wurde, war innerhalb der Arbeitsgruppe vorhanden.

7.1.3 Affinitätsaufreinigung der Antikörper anti-Cobl^{ARA} und anti-Cobl^{DBY}

Antiseren gegen His₆-TRX-Cobl 175-324 Δ262-286 (Ahuja 2007 [Dissertation]) sowie His₆-TRX-Cobl 750-1005 (Schwintzer 2008 [Masterarbeit]) vom 100. Tag nach Immunisierung von Kaninchen bzw. Meerschweinchen (durchgeführt von Pineda Antikörper-Service, Berlin) lagen in der Arbeitsgruppe vor. Unter Verwendung der Fusionsproteine GST-Cobl 175-324 und GST-Cobl 750-1005 wurden aus den entsprechenden Seren jeweils anti-Cobl-Antikörper aufgereinigt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Affinitätsgereinigte anti-Cobl-Antikörper, deren Antigene sowie die zur Aufreinigung verwendeten Fusionsproteine

Bezeichnung	Spezies	Antigen	Aufreinigung gegen
anti-Cobl ^{ARA}	rb	His ₆ -TRX-Cobl 175-324 Δ262-286	GST-Cobl 175-324
anti-Cobl ^{ARA}	gp1	His ₆ -TRX-Cobl 175-324 Δ262-286	GST-Cobl 175-324
anti-Cobl ^{ARA}	gp2	His ₆ -TRX-Cobl 175-324 Δ262-286	GST-Cobl 175-324
anti-Cobl ^{DBY}	rb	His ₆ -TRX-Cobl 750-1005	GST-Cobl 750-1005

Legende:

gp *guinea pig*, rb *rabbit*.

Anti-Cobl-Antikörper der His₆-TRX-Cobl 175-324 Δ262-286-Antiseren aus einem Kaninchen (rb) bzw. zwei Meerschweinchen (gp1, gp2) werden im Folgenden als anti-Cobl^{ARA}, anti-Cobl-Antikörper aus dem Antiserum gegen His₆-TRX-Cobl 750-1005 (rb) als anti-Cobl^{DBY} bezeichnet.

7.1.4 Charakterisierung der polyklonalen anti-Cobl-Antikörper im Western Blot

Nach SDS-PAGE der Lysate von HEK293-Zellen, die die Fusionsproteine EGFP-Cobl 1-408, EGFP-Cobl 175-324 Δ262-286, EGFP-Cobl 750-1005 sowie EGFP exprimierten, erfolgte der Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran mittels Western Blot. Der mit anti-GFP-Antikörper-Verdünnung inkubierte Blot bestätigte das Vorhandensein der in HEK293-Zellen rekombinant überexprimierten Proteine.

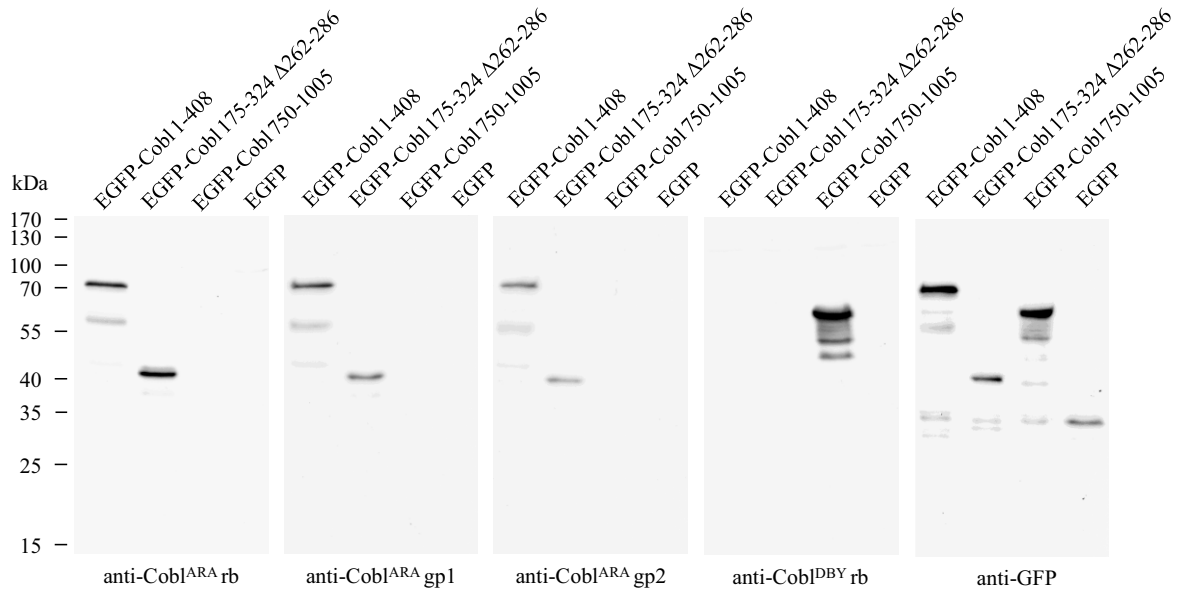


Abb. 10: Western Blot-Analyse von affinitätsgereinigten anti-Cobl-Antikörpern.

Lysate von HEK293-Zellen, die EGFP-Cobl 1-408, EGFP-Cobl 175-324 Δ 262-286, EGFP-Cobl 750-1005 sowie EGFP exprimieren, wurden auf 9,5%-Polyacrylamidgele aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und nach Western Blot mit einer Verdünnung der aufgereinigten Antikörper (anti-Cobl^{ARA} 1:100, anti-Cobl^{DBY} 1:500) inkubiert. Die affinitätsgereinigten Antikörper erkannten spezifisch ihr jeweiliges Antigen. Die Inkubation eines Blots mit anti-GFP-Antikörpern zeigte das Vorhandensein aller rekombinant überexprimierten Proteine.

Die anti-Cobl^{ARA}-Antikörper aus Kaninchen, Meerschweinchen 1 sowie Meerschweinchen 2 erkannten eingesetzt in einer 1:100-Verdünnung (Abb. 10), jedoch nicht bei 1:500 (Daten nicht gezeigt), spezifisch nur EGFP-Cobl 1-408 und EGFP-Cobl 175-324 Δ 262-286, während der anti-Cobl^{DBY}-Antikörper (Verdünnung 1:500) ausschließlich EGFP-Cobl 750-1005 detektierte (Abb. 10). Damit wurden erfolgreich gegen zwei distinkte Cobl-Molekülbereiche gerichtete anti-Cobl-Antikörper aus verschiedenen Spezies aufgereinigt, welche spezifisch ihr jeweiliges Antigen erkannten. Die Affinität der Antikörper, zumindest rekombinatem Cobl gegenüber, war für die jeweiligen Antikörper unterschiedlich.

7.1.5 Charakterisierung der polyklonalen anti-Cobl-Antikörper in Immunfluoreszenzanalysen

Eine nachfolgende mikroskopische Analyse sollte zeigen, ob die aufgereinigten und im Western Blot mittels denaturiertem Protein erfolgreich charakterisierten anti-Cobl-Antikörper auch überexprimiertes Cobl in COS-7-Zellen nach Paraformaldehyd-Fixierung erkennen.

Wie Abb. 11 zeigt, erkannte der affinitätsgereinigte anti-Cobl^{ARA} rb-Antikörper, der sich gegen das Epitop 175-324 Δ 262-286 richtet, in der Tat in einer Verdünnung von 1:100

selektiv nur die den Antigenbereich beinhaltenden Fusionsproteine EGFP-Cobl 1-1337 und EGFP-Cobl 1-408. Der Cobl CT-Bereich 750-1005 lieferte ebenso kein Signal wie EGFP.

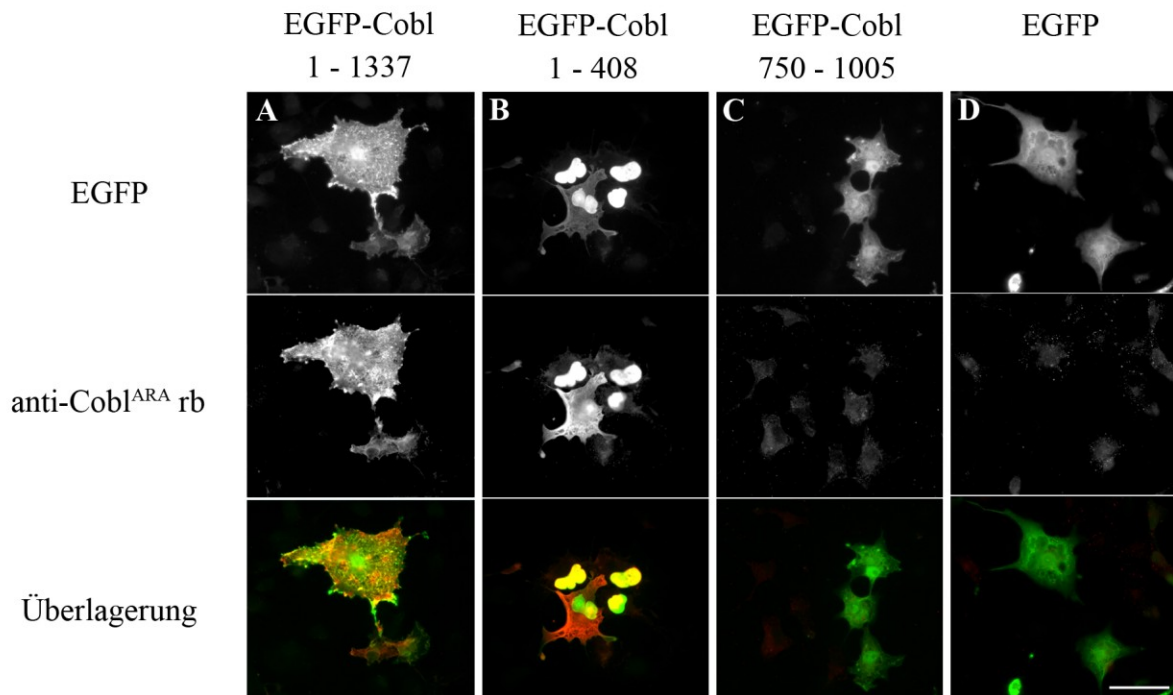


Abb. 11: Charakterisierung von affinitätsgereinigten anti-Cobl^{ARA} rb-Antikörpern in Immunfluoreszenzanalysen.

COS-7-Zellen wurden nach transienter Transfektion mit EGFP-Cobl 1-1337 (A), EGFP-Cobl 1-408 (B), EGFP-Cobl 750-1005 (C) sowie EGFP (D) mit anti-Cobl^{ARA} rb (Verdünnung 1:100) gefärbt. Transfizierte Zellen wurden über das EGFP-Signal (obere Reihe, grün) identifiziert. Nach Überlagerung des EGFP- sowie des anti-Cobl^{ARA} rb-Signals (mittlere Reihe, rot) zeigte sich, dass anti-Cobl^{ARA} rb spezifisch nur EGFP-Cobl 1-1337 und EGFP-Cobl 1-408 detektierte. Der Balken in D entspricht 50 μ m.

Die aus Meerschweinchen血清en aufgereinigten Antikörper anti-Cobl^{ARA} gp1 und anti-Cobl^{ARA} gp2 erkannten beide in einer Verdünnung von 1:100 spezifisch EGFP-Cobl 1-1337 sowie EGFP-Cobl 1-408, jedoch nicht EGFP-Cobl 750-1005 oder EGFP allein (Abb. 12).

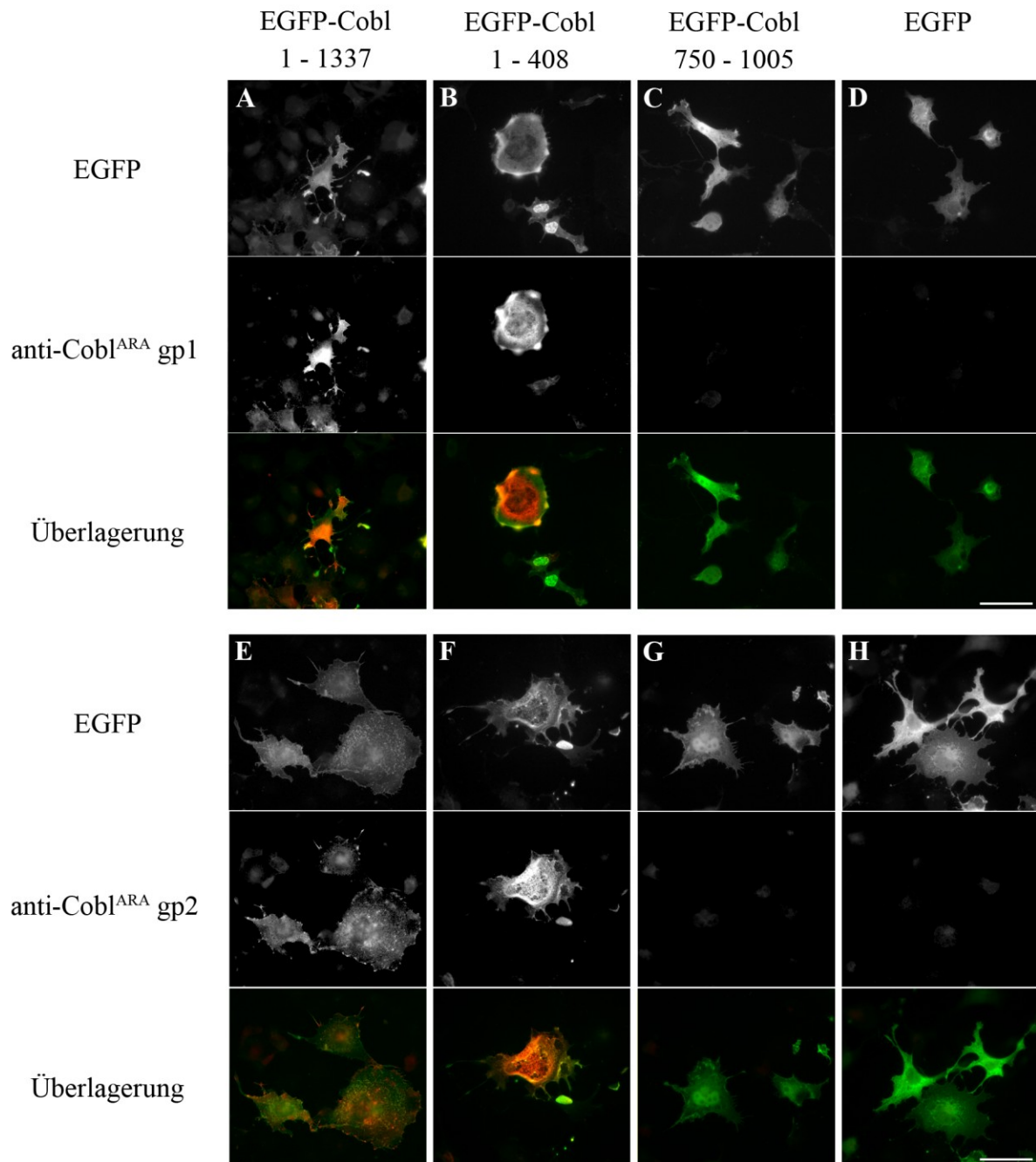


Abb. 12: Charakterisierung von affinitätsgereinigten anti-Cobl^{ARA} gp-Antikörpern in Immunfluoreszenzanalysen.

EGFP-Cobl 1-1337 (A, E), EGFP-Cobl 1-408 (B, F), EGFP-Cobl 750-1005 (C, G) sowie EGFP (D, H) wurden in COS-7-Zellen überexprimiert. In einer Verdünnung von 1:100 erfolgten die anti-Cobl^{ARA} gp1-Färbung (A-D) sowie die anti-Cobl^{ARA} gp2-Färbung (E-H). Die Überlagerung der Fluoreszenzsignale des EGFP sowie nach anti-Cobl^{ARA}-Färbung (mittlere Reihe, rot) zeigte, dass anti-Cobl^{ARA} gp1 und anti-Cobl^{ARA} gp2 spezifisch nur EGFP-Cobl 1-1337 und EGFP-Cobl 1-408 detektierten. Die Balken in D und H markieren 50 µm.

Die in Abb. 13 dargestellte Charakterisierung des polyklonalen Antikörpers anti-Cobl^{DBY} rb, der gegen das Epitop Cobl 750-1005 gerichtet ist, zeigt, dass dieser in einer 1:500-Verdünnung im Immunfluoreszenztest EGFP-Cobl 1-1337 und EGFP-Cobl 750-1005 detektierte. EGFP allein sowie EGFP-Cobl 1-408, die das Epitop nicht beinhalten, lieferten

kein Signal. Damit erkannte auch dieser Antikörper spezifisch das in COS-7-Zellen überexprimierte Antigen.

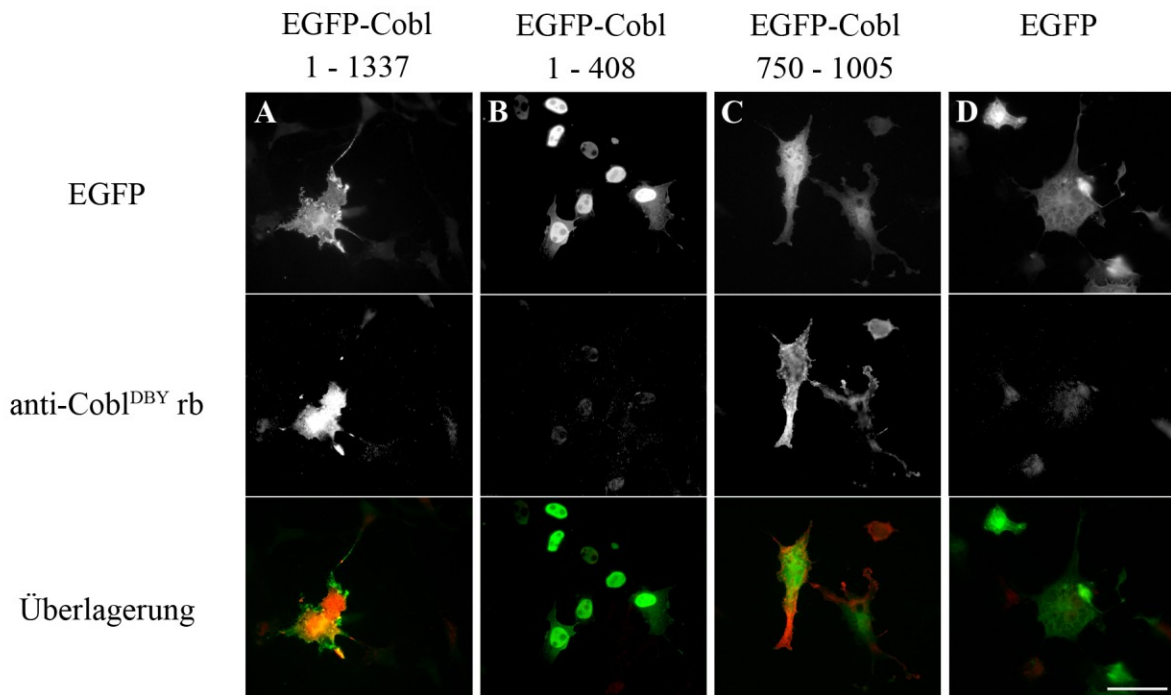


Abb. 13: Charakterisierung von affinitätsgereinigten anti-Cobl^{DBY} rb-Antikörpern in Immunfluoreszenzanalysen.

In COS-7-Zellen wurden EGFP-Cobl 1-1337 (A), EGFP-Cobl 1-408 (B), EGFP-Cobl 750-1005 (C) sowie EGFP (D) überexprimiert. Nach anschließender anti-Cobl^{DBY} rb-Färbung (Verdünnung 1:500) wurde deutlich, dass anti-Cobl^{DBY} rb (mittlere Reihe, rot) spezifisch nur EGFP-Cobl 1-1337 und EGFP-Cobl 750-1005 detektierte. Der Balken in D entspricht 50 µm.

Der Erfolg der Aufreinigung spezifischer Antikörper gegen Cobl 175-324 Δ 262-286 (anti-Cobl^{ARA}) sowie Cobl 750-1005 (anti-Cobl^{DBY}) konnte damit nicht nur durch Western Blot-Analysen sondern auch im Immunfluoreszenztest bestätigt werden. Die zu charakterisierenden Antikörper erkannten spezifisch in COS-7-Zellen überexprimierte rekombinante Proteine, welche das Epitop enthalten, gegen das sie gerichtet sein sollten. Die geringfügig unterschiedlichen Signalintensitäten, die zwischen den EGFP-Signalen und den Immunfluoreszenzsignalen vereinzelt beobachtet wurden, können sich dabei auf eine Maskierung der Epitope bzw. eine unterschiedliche Zugänglichkeit der Epitope für die Antikörper nach Paraformaldehyd-Fixierung und Saponin-Permeabilisierung zurückführen lassen.

Ebenso wie im Western Blot zeigten die Antikörper in den Immunfluoreszenzanalysen Unterschiede in der Affinität. Während anti-Cobl^{DBY} in einer Verdünnung von 1:500 verwendet werden konnte, mussten die anti-Cobl^{ARA}-Antikörper aus den Antiseren aller drei

Tiere fünffach höher konzentriert eingesetzt werden. In einer 1:500-Verdünnung lieferten die anti-Cobl^{ARA}-Antikörper noch kein spezifisches Immunfluoreszenzsignal. Für alle weiteren Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich die aus Kaninchenseren gewonnenen Antikörper anti-Cobl^{DBY} sowie anti-Cobl^{ARA} verwendet. Die entsprechenden Verdünnungen können dem Kapitel 6.6.6 entnommen werden.

7.2 Aufreinigung und Charakterisierung von polyklonalen anti-His₆-TRX-Antikörpern

Aus den für die anti-Cobl-Antikörper-Aufreinigung verwendeten Antiseren wurden entsprechend Tabelle 12 ebenfalls Antikörper gegen His₆-TRX aufgereinigt.

Tabelle 12: Affinitätsgereinigte anti-His₆-TRX-Antikörper, deren Antigene sowie die zur Aufreinigung verwendeten Fusionsproteine

Bezeichnung	Spezies	Antigen	Aufreinigung gegen
anti-His ^{ARA}	rb	His ₆ -TRX-Cobl 175-324 Δ262-286	His ₆ -TRX-Cobl 750-1005
anti-His ^{DBY}	rb	His ₆ -TRX-Cobl 750-1005	His ₆ -TRX-Cobl 175-324 Δ262-286

Legende:

rb *rabbit*.

Die für die Affinitätsreinigung notwendigen Fusionsproteine His₆-TRX-Cobl 175-324 Δ262-286 und His₆-TRX-Cobl 750-1005 waren innerhalb der Arbeitsgruppe vorhanden. Da die Antikörper den gleichen Serum-Aliquots wie die korrespondierenden anti-Cobl-Antikörper entstammten und exakt nach demselben Protokoll aufgereinigt wurden, sollten sie einerseits sehr ähnlich konzentriert sein und andererseits gegebenenfalls dieselben Verunreinigungen beinhalten. Die affinitätsgereinigten anti-His₆-TRX-Antikörper (eingesetzt in der gleichen Verdünnung wie die entsprechenden anti-Cobl-Antikörper) sind damit als Negativkontrolle für immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation von endogenem Cobl geeignet.

anti-His₆-TRX-Antikörper wurden aus dem Antiserum nach Immunisierung gegen His₆-TRX-Cobl 175-324 Δ262-286 gewonnen, gegen His₆-TRX-Cobl 750-1005 als Antigen aufgereinigt und als anti-His^{ARA} bezeichnet.

Weiterhin wurden durch L. Schwintzer anti-His₆-TRX-Antikörper aus dem Antiserum gegen His₆-TRX-Cobl 750-1005 aufgereinigt, wobei His₆-TRX-Cobl 175-324 Δ262-286 als Antigen verwendet wurde. Diese Antikörper erhielten die Bezeichnung anti-His^{DBY}.

Zur Charakterisierung der affinitätsgereinigten Antikörper wurden die Fusionsproteine His₆-TRX-Cobl 175-324 Δ 262-286 und EGFP-Cobl 175-324 Δ 262-286 sowie His₆-TRX-Cobl 750-1005 und EGFP-Cobl 750-1005 über SDS-PAGE (9,5%-Trenngel) aufgetrennt, mittels *Western Blotting* auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit den Antikörper-Verdünnungen inkubiert.

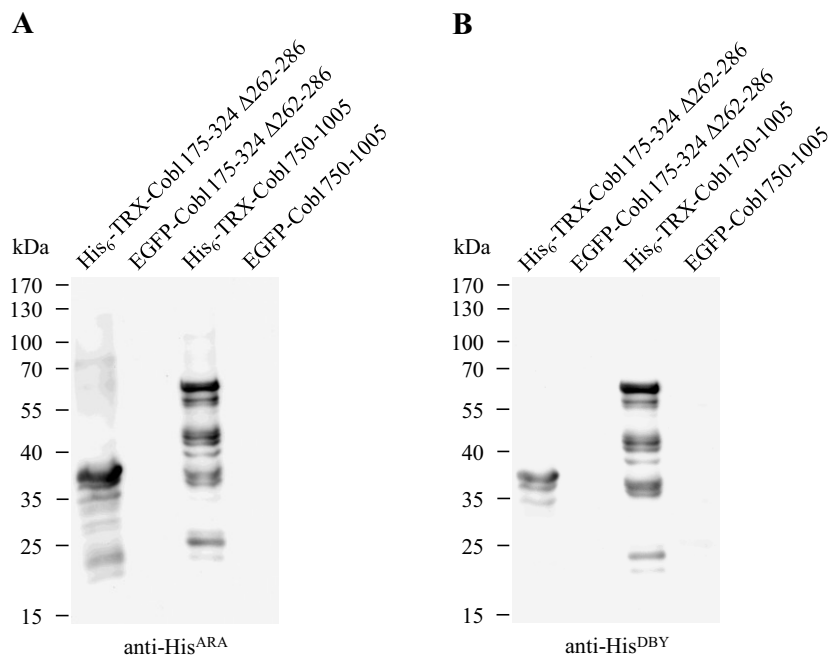


Abb. 14: Western Blot-Analyse von affinitätsgereinigten anti-His₆-TRX-Antikörpern.

Cobl 175-324 Δ 262-286 und Cobl 750-1005 wurden jeweils als His₆-TRX- (je 100 ng) sowie EGFP-Fusionsprotein (je 10 μ l HEK293-Zell-Lysat) auf ein 9,5%-Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und nach Western Blot mit einer 1:500-Verdünnung der aufgereinigten Antikörper anti-His^{ARA} (A) bzw. anti-His^{DBY} (B) inkubiert. Die His₆-TRX-Antikörper aus beiden Antiseren erkannten spezifisch His₆-TRX, jedoch nicht das Cobl-Fragment.

In Abb. 14 wird deutlich, dass die anti-His₆-TRX-Antikörper aus beiden Antiseren spezifisch den His₆-TRX-Anteil von Cobl-Fusionsproteinen erkannten. Cobl 175-324 Δ 262-286 sowie Cobl 750-1005 wurden jedoch nicht detektiert, wenn sie an EGFP gekoppelt vorlagen. Die erfolgreiche Expression von EGFP-Cobl 175-324 Δ 262-286 sowie EGFP-Cobl 750-1005 zeigt Abb. 10.

7.3 Cobl-Expression in corticalen Neuronen

In Western Blot-Analysen zeigte Cobl eine besonders hohe Expression im Gehirn (Ahuja et al. 2007). Eine detaillierte immunhistochemische Lokalisationsanalyse von Cobl sollte erste Hinweise darauf geben, in welchen Arealen, Zellen bzw. subzellulären Kompartimenten des

Gehirns eine besonders prominente Rolle dieses Aktinnukleators zu erwarten ist. Abb. 15 zeigt das Cobl-Signal in 55 µm-dünnen Hirnschnitten nach Inkubation mit anti-Cobl^{ARA}- sowie anti-Cobl^{DBY}-Antikörpern und konfokaler Mikroskopie (Abb. 15 B, D). Die als Negativkontrollen verwendeten Antikörper anti-His^{ARA} und anti-His^{DBY} (Abb. 15 A, C) lieferten lediglich minimale unspezifische Signale vor allem im Bereich der Hirnhäute.

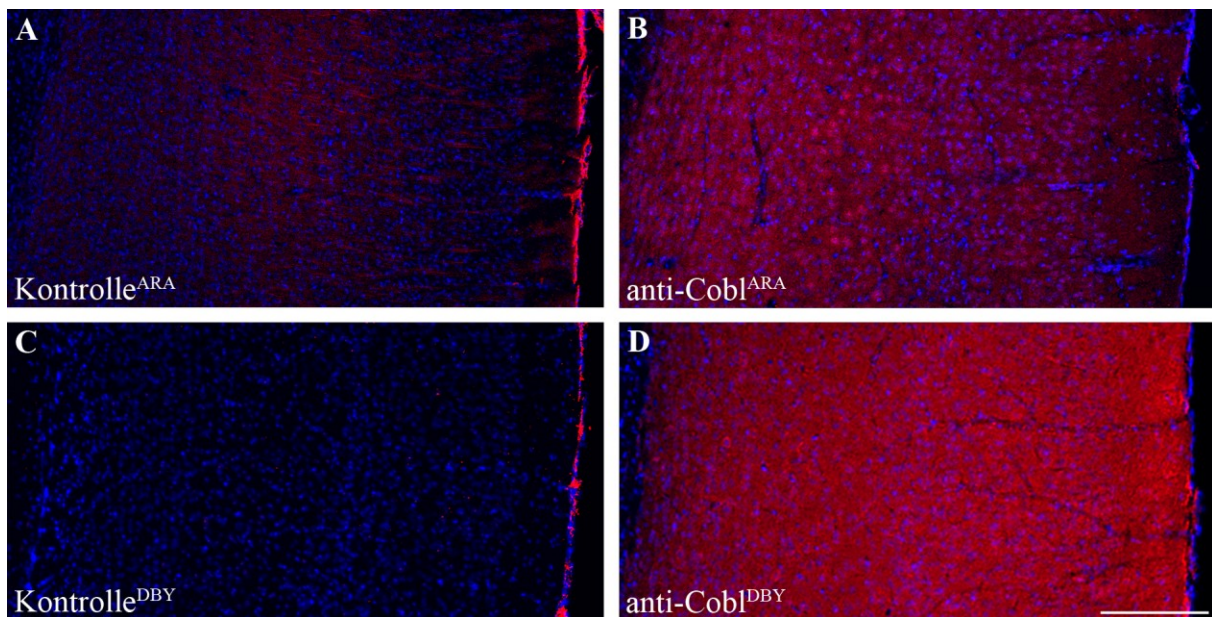


Abb. 15: Immunhistochemische Analyse der Cobl-Expression im cerebralen Cortex.

Die anti-Cobl Antikörper anti-Cobl^{ARA} (B, rot) und anti-Cobl^{DBY} (D, rot) stellten die hohe Expression des Aktinnukleators Cobl im cerebralen Cortex dar. Die als Negativkontrollen eingesetzten Antikörper anti-His^{ARA} (A) sowie anti-His^{DBY} (C) zeigten mit Ausnahme der Hirnhäute an der Gewebeoberfläche (rechts) ein sehr schwaches Hintergrundsignal. Dies bestätigte die Spezifität der anti-Cobl-Immunfärbungen. Die Hervorhebung der Zellkerne (blau) erfolgte durch Inkubation der Schnitte in einer DAPI-Verdünnung. Der Balken in D zeigt 250 µm.

Cobl wurde im cerebralen Cortex spezifisch durch beide verwendeten affinitätsgereinigten Antikörper detektiert. Die Signalintensitäten der Immundetektion unterschieden sich allerdings. Während nach Färbung mit anti-Cobl^{ARA} ein Immunfluoreszenzsignal mittlerer Intensität mit Anreicherung in einzelnen großen Zellen, vor allem deren Perikarien, zu beobachten war, führte die anti-Cobl^{DBY}-Färbung in der gleichen Verdünnung zu einem gleichmäßigen, sehr intensiven Signal des Cortex.

Die zu beobachtende intensive Cobl-Expression im cerebralen Cortex konnte durch Immunfluoreszenzanalysen in der primären Kultur corticaler Neurone bestätigt werden (Abb. 16). Aus dem Gehirn von Rattenembryonen präparierte und für 5 Tage kultivierte corticale Neuronen wurden mit 4%-PFA bzw. Methanol fixiert und immuncytochemisch mit anti-Cobl-Antikörpern gefärbt.

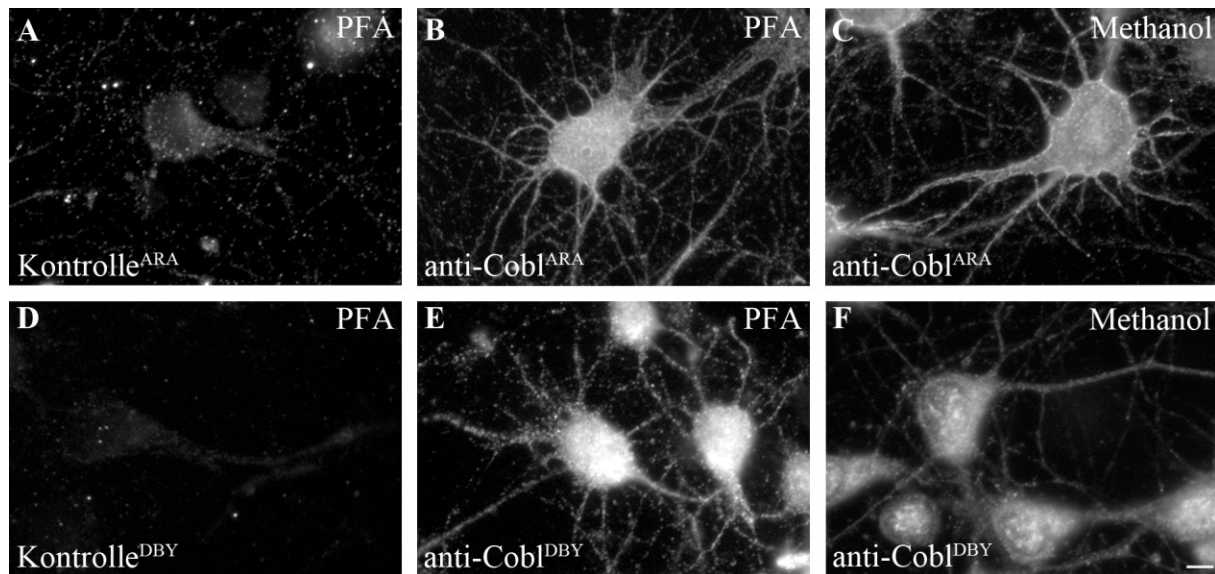


Abb. 16: Immunocytochemische Detektion von Cobl in primären corticalen Neuronen.

5 Tage kultivierte Cortex-Neuronen zeigten nach Fixierung in 4%-PFA (A, B, D, E) bzw. Methanol (C, F) und immunocytochemischer Färbung endogen exprimiertes Cobl. Während nach Inkubation mit anti-Cobl^{ARA} Cobl akkumuliert an der Zellmembran erschien (B, C), detektierte anti-Cobl^{DBY} die Expression von Cobl vor allem im Bereich des Perikaryons (E, F). Als Negativkontrollen wurden die Antikörper anti-His^{ARA} (A) sowie anti-His^{DBY} (D) verwendet. Der Balken in F zeigt 4 µm.

Beide verwendete Antikörper (anti-Cobl^{ARA} und anti-Cobl^{DBY}) detektierten eine Cobl-Expression in Perikarien und Neuriten der Cortex-Neuronen; allerdings waren hierbei distinkte Unterschiede in der subzellulären Lokalisation auffällig. Während durch anti-Cobl^{ARA} detektiertes Cobl nach PFA- oder Methanol-Fixierung unter anderem akkumuliert an der Zellmembran erschien, zeigte sich dieses Phänomen nicht nach Immunfluoreszenzfärbung mittels anti-Cobl^{DBY}. In diesem Fall wiesen die Neuriten ein punktiertes Signal auf und vor allem im Zellkörper wurde eine Cobl-Immunreaktivität detektiert. Insbesondere nach Methanol-Fixierung und anti-Cobl^{DBY}-Immunfluoreszenzfärbung war eine nukleäre bzw. perinukleäre Cobl-Immunreaktivität zu beobachten.

Die als Kontrollen eingesetzten Immunfluoreszenzfärbungen mit anti-His^{ARA} und anti-His^{DBY} zeigten auch in diesem Fall die Spezifität des detektierten Cobl-Signals.

7.4 Untersuchungen zur Expression und Funktion von Cobl in hippocampalen Neuronen

7.4.1 Analyse der Cobl-Expression

Die konfokalmikroskopische Analyse von sagittalen Hirnschnitten auf Cobl-Expression im Hippocampus zeigte unabhängig vom eingesetzten anti-Cobl-Antikörper die endogene

Lokalisation des Aktinnukleators Cobl in Gyrus dentatus (GD) sowie Cornu ammonis (CA) (Abb. 17). Auch im Rahmen dieser Untersuchungen lieferte der Antikörper anti-Cobl^{DBY} bei gleicher Verdünnung ein etwas intensiveres Signal als anti-Cobl^{ARA}. Einzelne hippocampale Pyramidenzellen waren durch eine hohe Signalintensität zum Beispiel in Abb. 17 D (Region CA3) deutlich hervorgehoben. Um unabhängig vom Cobl-Signal die Architektur des Hippocampus darzustellen, wurden die Zellkerne mittels DAPI angefärbt.

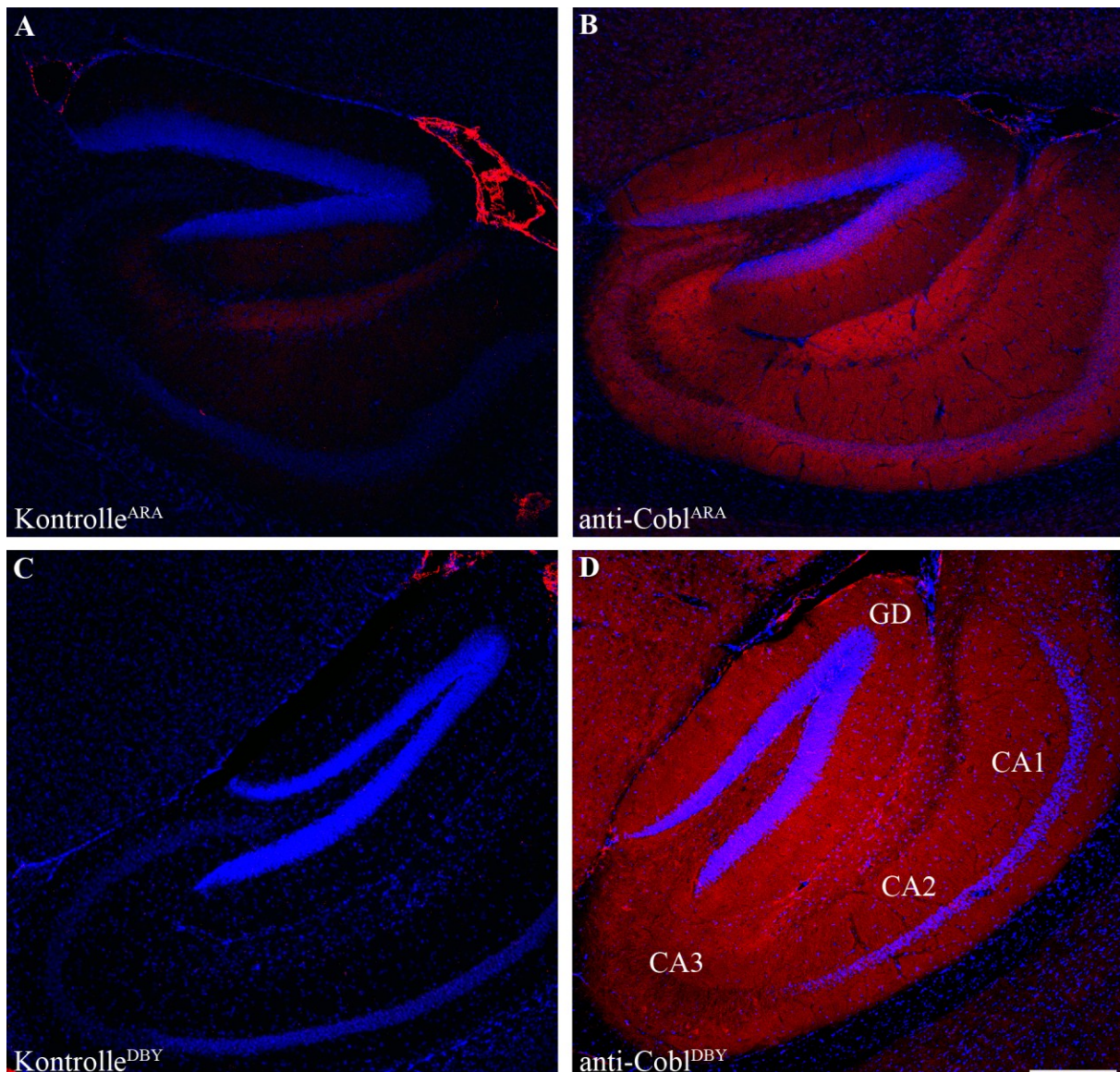


Abb. 17: Immunhistochemische Analyse der Cobl-Expression im Hippocampus.

Die Färbungen von sagittalen Hirnschnitten (55 μ m) mit den anti-Cobl Antikörpern anti-Cobl^{ARA} (B) und anti-Cobl^{DBY} (D) zeigten die hohe Expression des Aktinnukleators Cobl (rot) im Gyrus dentatus (GD) sowie den Regionen CA3 bis CA1 des Hippocampus. Die Darstellung der Zellkerne (blau) erfolgte mittels DAPI. Immunhistochemische Färbungen unter Verwendung von anti-His^{ARA} (A) und anti-His^{DBY} (C) verdeutlichten die Spezifität des hippocampalen Cobl-Signals. Der Balken in D entspricht 250 μ m.

Die Cobl-Expression in hippocampalen Pyramidenzellen wurde in höherer Vergrößerung besonders deutlich (Abb. 18). Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Cobl-Immunreaktivität in Verbindung mit dem DAPI-Signal verdeutlichten dabei eine Lokalisation von Cobl auch im Zellkern.

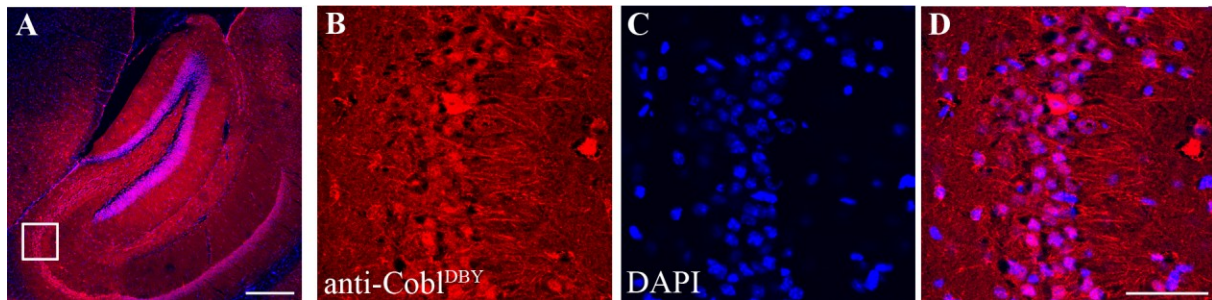


Abb. 18: Immunhistochemische Analyse der nukleären Cobl-Lokalisation.

Die immunhistochemische anti-Cobl-Färbung sagittaler Gehirnschnitte zeigte die hohe Expression von Cobl im Hippocampus. Der in A markierte Bereich des Hippocampus ist in B-D vergrößert dargestellt, wobei B und C selektiv die Signale von anti-Cobl^{DBY}-Färbung (B) und DAPI (C) zur Darstellung der Zellkerne abbilden. Die Kolokalisationen in A und D zeigen die nukleäre Lokalisation von Cobl. Der Balken stellt 250 μm in A und 50 μm in D dar.

Primäre hippocampale Neuronen zeigten eine Lokalisation von endogenem Cobl, die derjenigen in kultivierten corticalen Neuronen entsprach (vergleiche Abb. 16, Daten nicht gezeigt). Weiterhin ließen sich in 21 Tage kultivierten primären hippocampalen Neuronen Cobl-Anreicherungen im Bereich der Dendriten beobachten.

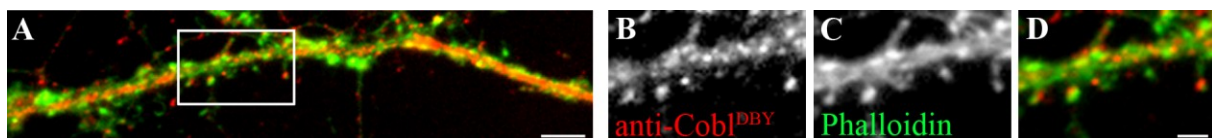


Abb. 19: Darstellung der Cobl-Expression in primären hippocampalen Neuronen.

In 21 Tage kultivierten primären hippocampalen Neuronen lokalisierte Cobl (A, B, D, rot in A und D) zu Dendritenschaft sowie dendritischen *spines*, welche durch F-Aktin-bindendes fluoreszenzmarkiertes Phalloidin (A, C, D, grün in A und D) dargestellt wurden. Der in A markierte Bereich ist in B-D vergrößert dargestellt. Der Balken entspricht 5 μm in A und 2 μm in D.

Abb. 19 A zeigt einen Dornfortsätze-tragenden Dendritenabschnitt als Überlagerung des Cobl- (rot) und F-Aktin-Signals (grün). In der Vergrößerung des ausgewählten Bereichs (B-D) wird deutlich, dass Cobl zu den F-Aktin-reichen dendritischen *spines* sowie dem Dendritenschaft lokalisierte und akkumuliert vor allem in pilzförmigen *spines* vorlag. Kolokalisationsuntersuchungen von Cobl und Synapsin, einem in präsynaptischen Strukturen angereicherten Protein, veranschaulichen in Abb. 20, dass alle Synapsin-positiven Punkte (grün) in direkter räumlicher Nähe zu Cobl (rot) lagen. Cobl war darüber hinaus auch in

Synapsin-negativen Bereichen, die dem Dendritenschaft entsprechen, zu finden. Diese Ergebnisse legten eine unter anderem synaptische Lokalisation von Cobl nahe, ermöglichten jedoch keine exakte Aussage bezüglich Prä- oder Postsynapse.

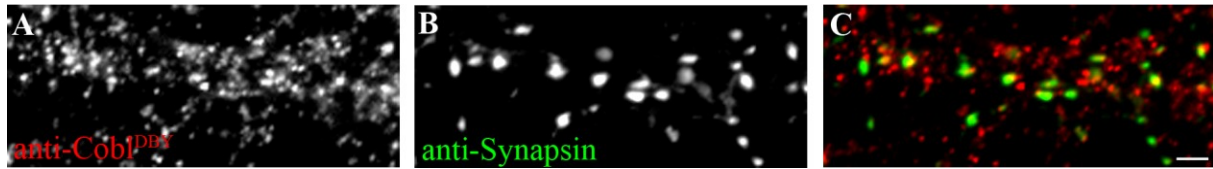


Abb. 20: Analyse der synaptischen Lokalisation von Cobl in primären hippocampalen Neuronen.

Dissoziierte primäre hippocampale Neurone wurden nach 21 Tagen in Kultur immuncytochemisch gegen Cobl und den Synapsenmarker Synapsin gefärbt. Alle Synapsin-positiven Punkte (B, C, grün in C) lagen in unmittelbarer Nachbarschaft zu Cobl (A, C, rot in C), was unter anderem eine synaptische Lokalisation des Aktinnukleators Cobl nahe legte. Der Balken in C zeigt 2 μ m.

7.4.2 Funktionelle Analysen

Der Aktinnukleator Cobl wurde als unabdingbar für die frühe neuronale Morphogenese und dendritische Arborisierung charakterisiert (Ahuja et al. 2007). In der späten neuronalen Morphogenese bildet der Großteil exzitatorischer Synapsen dendritische *spines* aus, deren Induktion, Reifung aber auch Plastizität abhängig von der Dynamik des Aktincytoskeletts ist (Matus 2000). Es schien daher nahe liegend, dass Cobl ebenfalls in der Ausbildung und/oder plastischen Reorganisation von dendritischen *spines* von funktioneller Bedeutung ist. Um die Rolle von Cobl-vermittelter Aktinnukleation in der späten neuronalen Morphogenese aufzuklären, wurde die Expression von Cobl in primären hippocampalen Neuronen an den Tagen 10 bis 12 in Kultur gezielt beeinflusst. Die Anzahl der jeweils analysierten dendritischen *spines* ist mit n angegeben.

In transfizierten primären hippocampalen Neuronen, in denen durch RNAi-vermittelten *knockdown* die endogene Cobl-Expression vermindert wurde, wurden morphologische Veränderungen im Vergleich zu Kontrollzellen nach Transfektion des RNAi-Vektors pRNAT-H1.1/Hygro betrachtet.

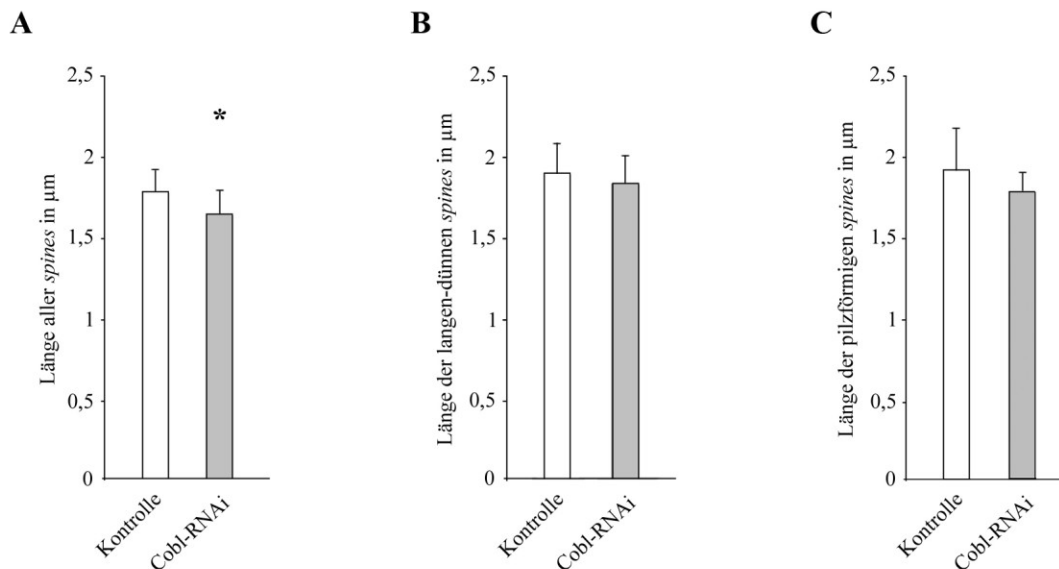


Abb. 21: Morphologische Analysen zur *spine*-Länge nach RNAi-vermitteltem Cobl-knockdown.

Primäre hippocampale Neuronen wurden nach 10 Tagen in Kultur mit einem Cobl-RNAi-Vektor und dem RNAi-Vektor pRNAT-H1.1/Hygro als Kontrolle transfiziert sowie 48 h später fixiert. Die mittlere Länge aller analysierten *spines* (A) zeigte nach Cobl-knockdown ($n = 981$) eine signifikante Reduktion im Vergleich zu *spines* der Kontrollzellen ($n = 702$). Die mittleren Längen der langen-dünnen (B) und pilzförmigen *spines* (C) lagen nach Cobl-knockdown geringfügig unter dem Kontrollniveau. Die Daten sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt und wurden in einem zweiseitigen, ungepaarten t-Test getestet (** $p < 0,001$; * $0,001 \leq p < 0,01$; * $0,01 \leq p < 0,05$).

Die in Abb. 21 dargestellten Ergebnisse zur Längenanalyse von *spines* zeigen, dass der *knockdown* von endogenem Cobl zu einer signifikanten Verkürzung der durchschnittlichen *spine*-Länge führte. Dieser Effekt scheint vor allem durch Summation bedingt zu sein, denn die durchschnittlichen Längen der langen-dünnen und der pilzförmigen *spines* zeigten nach Cobl-RNAi-Transfektion nur den Trend einer leichten Verkürzung. Auch die Länge der stummeligen *spines* blieb mit $0,55 \mu\text{m}$ im Vergleich zur Kontrolle ($0,57 \mu\text{m}$) in etwa unverändert (Daten nicht grafisch dargestellt).

Über die Reduktion der mittleren *spine*-Länge hinaus konnten bei verminderter Cobl-Expression keine weiteren morphologischen Veränderungen der *spines* beobachtet werden. So erschienen die Kopfweiten pilzförmiger *spines* mit $0,46 \mu\text{m}$ nach Cobl-knockdown und $0,47 \mu\text{m}$ in der Kontrolle unauffällig (Daten nicht grafisch dargestellt).

Zur Bestimmung der *spine*-Dichte wurden für jeden ausgewerteten Dendritenabschnitt die Dornfortsätze gezählt und als Anzahl an *spines* je $10 \mu\text{m}$ dendritischen Schaftes angegeben.

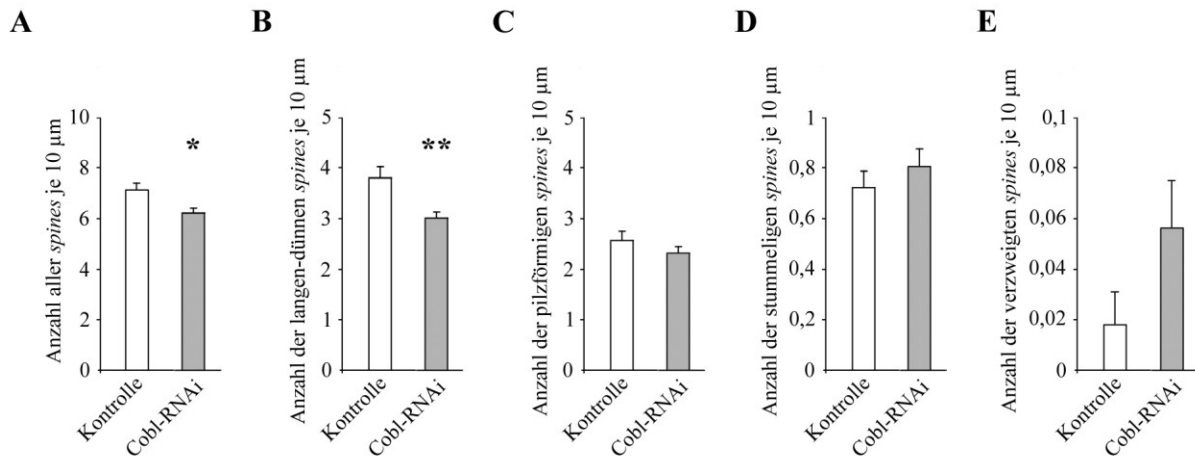


Abb. 22: Bestimmung der *spine*-Dichte nach RNAi-vermitteltem Cobl-knockdown.

Die *spines* primärer hippocampaler Neuronen zeigten bei herunterregulierter Cobl-Expression (n = 981) zwischen den Tagen 10 und 12 in Kultur im Vergleich zu Kontrollzellen, die den Kontrollvektor pRNAT-H1.1/Hygro exprimierten (n = 702), eine signifikant um 12,8% verringerte Dichte (A). Die Dichte der langen-dünnen *spines* war um 20,7% signifikant vermindert (B). Eine ähnliche Tendenz wurde bei den pilzförmigen *spines* beobachtet (C), während stummelige *spines* eher höher frequent auftraten (D). Verzweigte *spines* zeigten ein mehr als dreifach häufigeres Vorkommen als in der Kontrolle (E). Die Daten sind als Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes dargestellt und wurden in einem zweiseitigen, ungepaarten t-Test getestet (** $p < 0,001$; ** $0,001 \leq p < 0,01$; * $0,01 \leq p < 0,05$).

Anhand der grafischen Darstellungen in Abb. 22 wird deutlich, dass hippocampale Neuronen nach Herunterregulierung der endogenen Cobl-Expression im Vergleich zur Kontrolle insgesamt um 12,8% signifikant ($p = 0,011$) weniger *spines* am Dendritenschaft ausbildeten. Betrachtete man dazu die Dichte der *spines* jeweils einer morphologischen Klasse, so zeigten sich qualitative Unterschiede. Während sich in der Population der langen-dünnen *spines* die Dichte signifikant ($p = 0,001$) um 20,7% verminderte, zeigten pilzförmige *spines* lediglich einen Trend zur Dichte-Verminderung. Stummelige und verzweigte *spines* traten nach RNAi-vermitteltem Cobl-knockdown hingegen tendenziell häufiger auf.

Die Ergebnisse dieser Dichte-Analyse spiegelten sich in der Veränderung der relativen Anteile der morphologischen *spine*-Klassen wider (Abb. 23). Während lange-dünne *spines* in Cobl-defizienten Neuronen im Vergleich zur Kontrolle einen geringeren Anteil an der Gesamtheit der dendritischen *spines* stellten, verschoben sich die Relationen zugunsten der stummeligen *spines*. Auch für pilzförmige sowie verzweigte *spines* wurden nach Cobl-knockdown im Vergleich zur Kontrolle erhöhte prozentuale Anteile bestimmt.

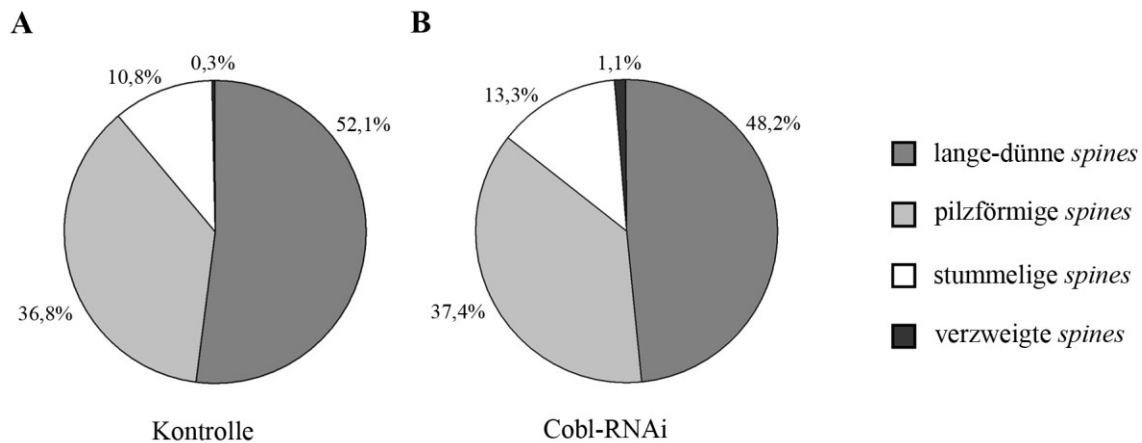


Abb. 23: Relative Anteile der morphologischen *spine*-Klassen nach RNAi-vermitteltem Cobl-knockdown.

Die prozentualen Anteile der *spines* verschiedener morphologischer Klassen nach Transfektion von Kontrollvektor pRNAT-H1.1/Hygro (A, n = 702) bzw. Cobl-RNAi-Vektor (B, n = 981) in primären hippocampalen Neuronen sind im Kreisdiagramm dargestellt. Cobl-knockdown zwischen den Tagen 10 und 12 in Kultur führte neben der Verminderung des Anteils an langen-dünnen *spines* zu einem höher prozentualen Anteil vor allem der stummeligen, in geringerem Umfang auch der pilzförmigen sowie verzweigten *spines*.

Zusammenfassend konnte nach *knockdown* von endogenem Cobl eine verminderte Länge und Anzahl sowohl der langen-dünnen als auch der pilzförmigen *spines* beobachtet werden. Der nachweisbare Anstieg in der Dichte stummeliger *spines* trug zur Verschiebung der relativen Anteile der einzelnen *spine*-Klassen zugunsten dieser *spine*-Form bei. Insgesamt ließ sich bei verminderter Cobl-Expression eine Verkürzung der mittleren *spine*-Länge feststellen.

Um die funktionelle Bedeutung von Cobl-vermittelter Aktinnukleation in der Ausbildung und Reifung dendritischer *spines* genauer zu charakterisieren, wurden weiterhin ausgewählte EGFP-fusionierte Cobl-Fragmente überexprimiert und die *spines* in derartig manipulierten Neuronen morphologisch analysiert. So konnten wesentliche Einblicke in die Funktionalität einzelner Bereiche des Cobl-Moleküls erlangt werden.

Die Überexpressionseffekte des nicht-Aktin-nukleierenden, aber die Bindungsstellen für Abp1 und Syndapin I beinhaltenden Cobl N-Terminus (EGFP-Cobl 1-408) wurden ebenso analysiert wie die des Cobl C-Terminus (EGFP-Cobl 1176-1337), der über drei WH2-Domänen eine Aktinnukleation vermittelt. Die Kombination aus den genannten Cobl-Fragmenten (Cobl NT + CT), EGFP-Cobl 1-408, 1176-1337 Δ 262-286, sollte schließlich einen weiteren Einblick in das funktionelle Zusammenspiel beider Molekülbereiche ermöglichen. Morphologische Analysen erfolgten entsprechend Kapitel 6.4.2.4 im Vergleich zu den *spines* von Kontrollzellen nach EGFP-Überexpression.

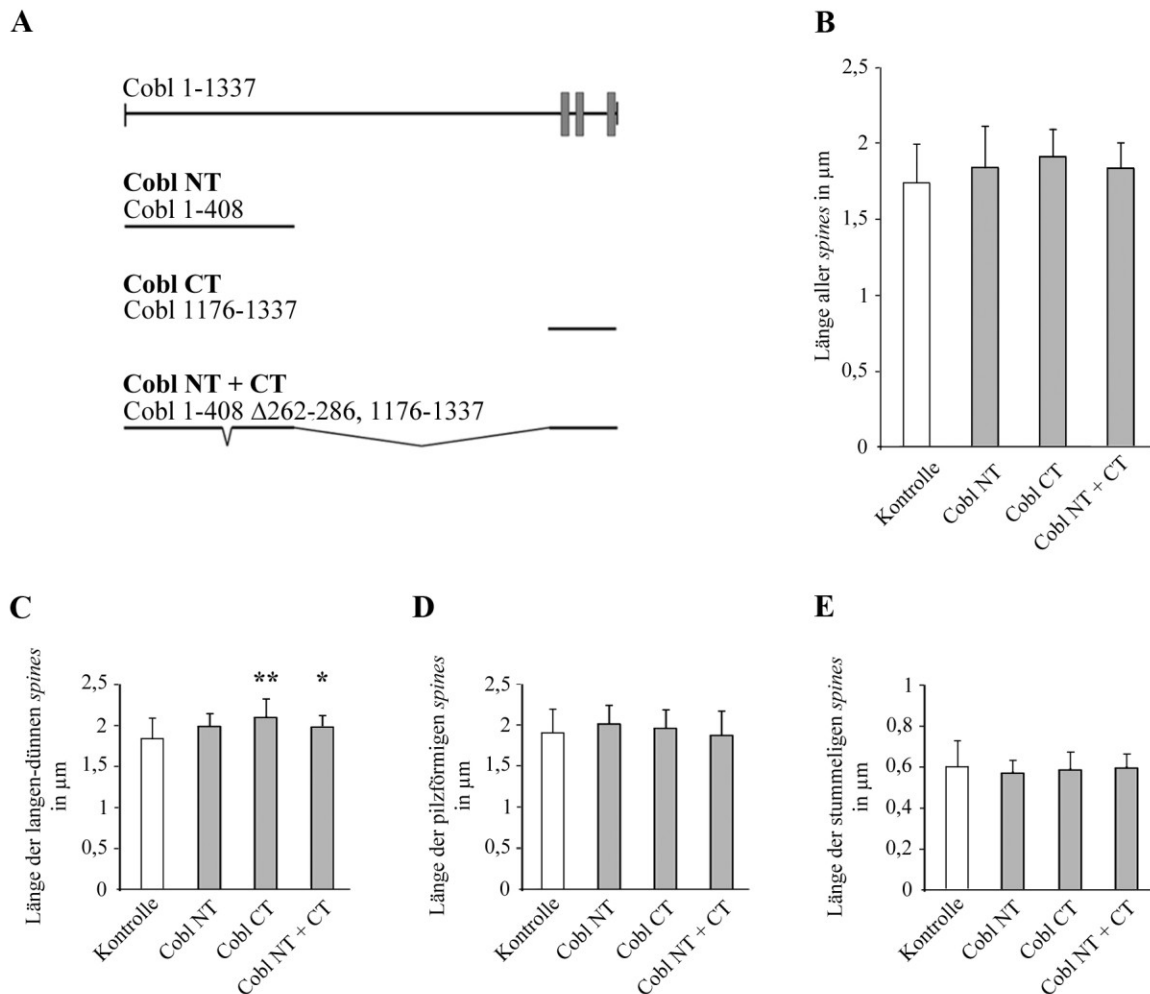


Abb. 24: Morphologische Analysen zur *spine*-Länge nach Überexpression von EGFP-Cobl-Konstrukten.

A zeigt Cobl 1-1337 mit den drei C-terminalen WH2-Domänen sowie die in Neuronen überexprimierten EGFP-Cobl-Fusionsproteine. Bei Expression von Cobl NT ($n = 431$), Cobl CT ($n = 1.100$) und Cobl NT + CT ($n = 921$) in primären hippocampalen Neuronen (Tag 10 bis 12 in Kultur) zeigte sich ein Trend zu einer Erhöhung der durchschnittlichen *spine*-Länge (B). Cobl CT und Cobl NT + CT riefen eine signifikante Verlängerung der langen-dünnen *spines* hervor (C). Die Länge von pilzförmigen (D) und stummeligen *spines* (E) blieb unabhängig vom transfizierten Konstrukt weitgehend unverändert. Die Daten sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt und wurden in einem zweiseitigen, ungepaarten t-Test gegen die Kontrolle EGFP ($n = 560$) getestet (** $p < 0,001$; * $0,001 \leq p < 0,01$; * $0,01 \leq p < 0,05$).

Die Überexpression des Aktin-nukleierenden Cobl C-Terminus führte zu einer signifikanten Verlängerung der langen-dünnen *spines* um 14,8%. Ein Trend zur *spine*-Verlängerung ließ sich mit einer Längenzunahme von 9,7% auch für die Gesamtheit aller *spines* bei Cobl CT-Überexpression beobachten. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich nach Überexpression von Cobl NT + CT. In diesem Fall war die Länge der langen-dünnen *spines* im Vergleich zur Kontrolle um 8,2% signifikant erhöht. Unabhängig vom transfizierten Konstrukt blieben die Längen von pilzförmigen und stummeligen *spines* weitgehend unverändert.

Die quantitative Analyse der Kopfweiten von pilzförmigen *spines* ergab keine signifikanten Veränderungen nach Überexpression von Cobl NT, Cobl CT oder Cobl NT + CT im Vergleich zur Kontrolle.

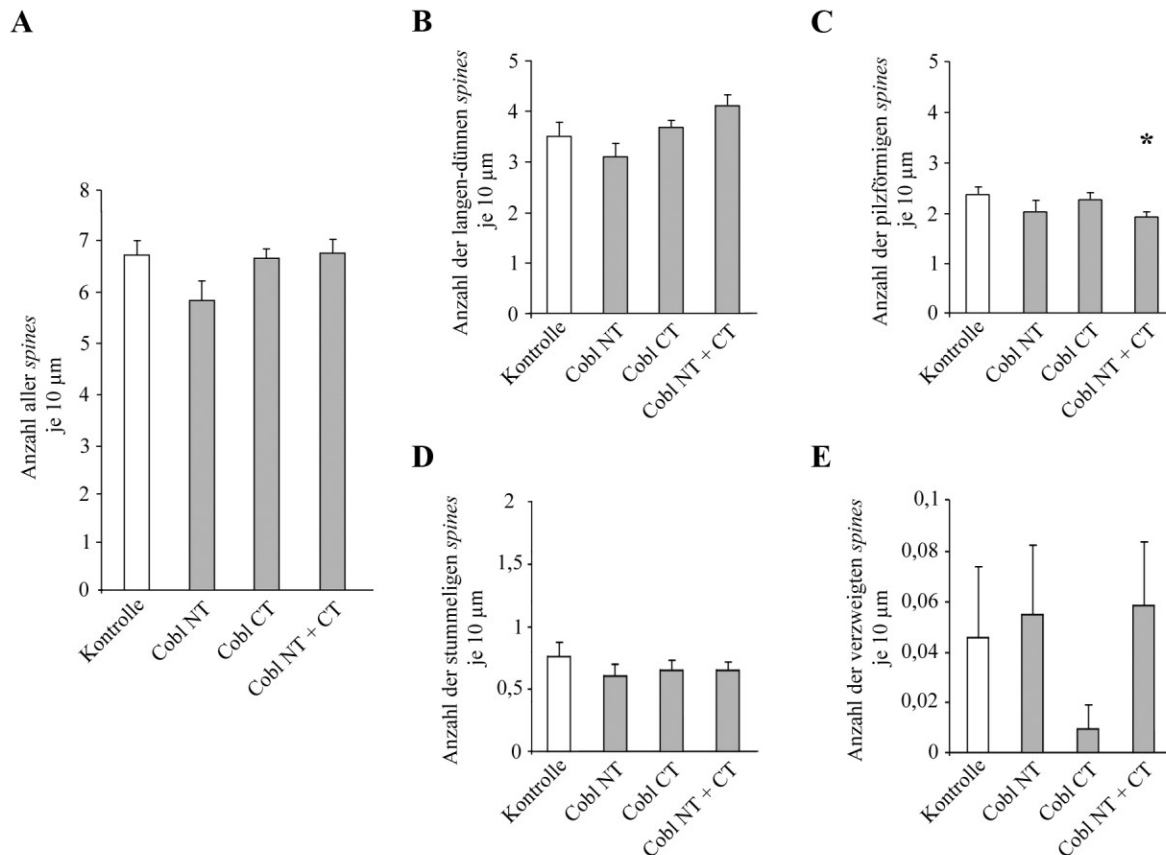


Abb. 25: Bestimmung der *spine*-Dichte nach Überexpression von EGFP-Cobl-Konstrukten.

Die Balkendiagramme zeigen den Effekt der Überexpression der Fusionsproteine EGFP-Cobl NT (n = 431), EGFP-Cobl CT (n = 1.100) sowie EGFP-Cobl NT + CT (n = 921) in primären hippocampalen Neuronen an den Tagen 10 bis 12 in Kultur auf die Gesamt-*spine*-Dichte (A) sowie die Anzahl an langen-dünnen (B), pilzförmigen (C), stummeligen (D) und verzweigten (E) *spines* je 10 µm Dendritenabschnitt. Die Daten sind als Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes dargestellt und wurden in einem zweiseitigen, ungepaarten t-Test gegen die *spine*-Dichten nach EGFP-Überexpression (n = 560) getestet (** $p < 0,001$; ** $0,001 \leq p < 0,01$; * $0,01 \leq p < 0,05$).

Bei der Auswertung der Effekte der Überexpression der in Abb. 24 A schematisch gezeichneten Cobl-Fusionsproteine in Bezug auf die *spine*-Dichten zeigten sich distinkte Effekte. Wie in Abb. 25 dargestellt ist, wurde nach Überexpression von Cobl NT + CT eine signifikant verminderte Dichte an pilzförmigen *spines* bei tendenziell mehr langen-dünnen *spines* beobachtet. Ein Trend zur geringeren Dichte an langen-dünnen *spines*, der sich auf die gesamte *spine*-Dichte auswirkte, resultierte hingegen aus Cobl NT-Überexpression. Auffällig war weiterhin eine um 79,4% verminderte Dichte an verzweigten *spines*, die sich nach Cobl CT-Überexpression beobachten ließ. Dieses Ergebnis zeigte aufgrund des insgesamt seltenen

Auftretens der verzweigten *spines* sowie der im Verhältnis dazu sehr starken Streuung der Dichte keine Signifikanz.

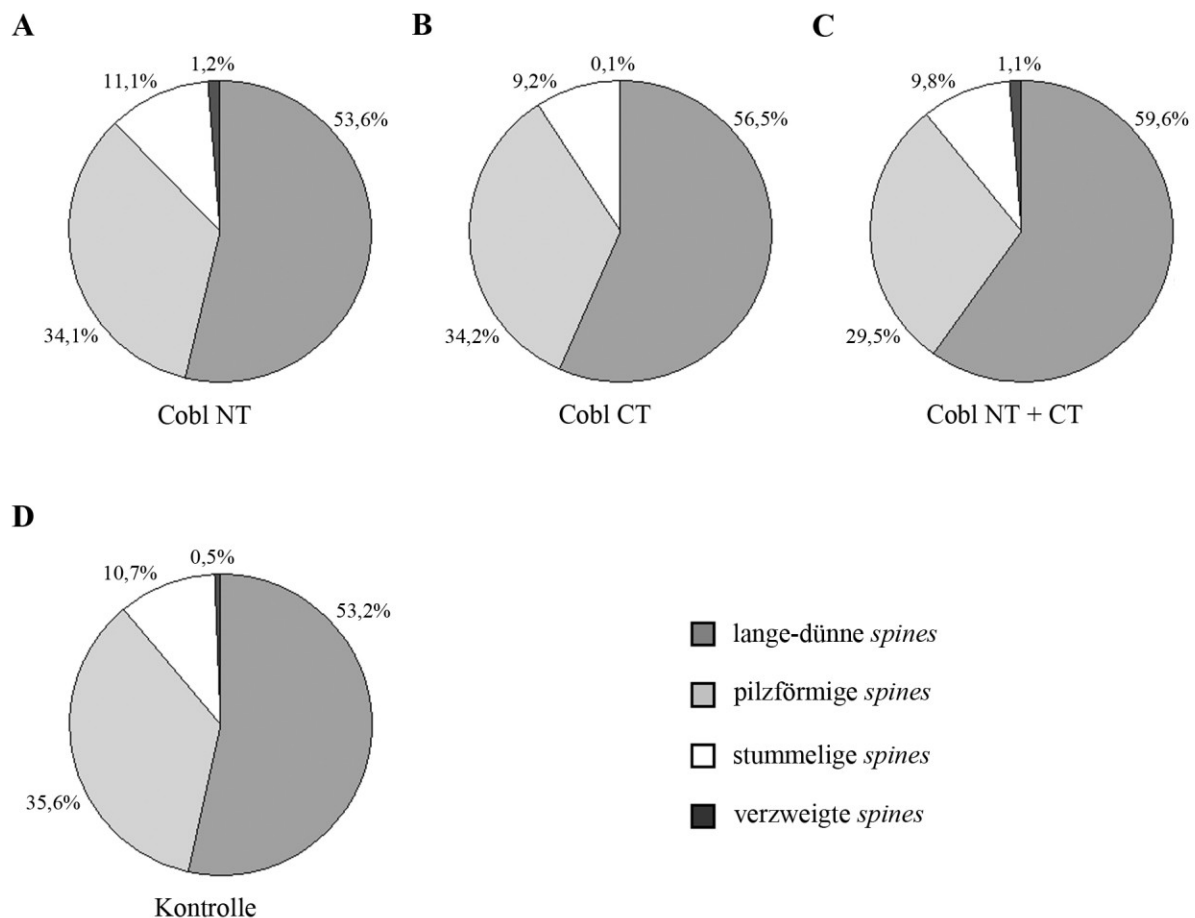


Abb. 26: Relative Anteile der zu einer morphologischen Klasse gehörenden *spines* nach Überexpression verschiedener EGFP-Cobl-Konstrukte.

Die prozentualen Anteile der morphologischen *spine*-Klassen nach Überexpression von EGFP-Cobl NT (A, n = 431), EGFP-Cobl CT (B, n = 1.100) sowie EGFP-Cobl NT + CT (C, n = 921) bzw. der EGFP-Kontrolle (D, n = 560) in primären hippocampalen Neuronen (Tag 10 bis 12 in Kultur) sind in Kreisdiagrammen dargestellt. Die Überexpression von EGFP-Cobl CT und EGFP-Cobl NT + CT führte zu einer geringfügigen Erhöhung des relativen Anteils der langen-dünne *spines*.

Die Ergebnisse der Dichte-Analysen (Abb. 25) zeigten sich in den relativen Anteilen der einzelnen *spine*-Klassen (Abb. 26) nach Überexpression von Cobl NT, Cobl CT oder Cobl NT + CT im Vergleich zur Kontrolle. Die durch Cobl NT + CT vermittelten signifikanten Dichte-Veränderungen führten zu einer Erhöhung des prozentualen Anteils an langen-dünne *spines* zu Lasten der pilzförmigen *spines*, der schwächer ausgeprägt auch für Cobl CT beobachtet wurde. Verzweigte *spines* kamen in der Kontrolle mit einer relativen Häufigkeit von 0,5% vor. Während Cobl CT-Überexpression eine Verminderung dieses Anteils auf 0,1% zur Folge hatte, wurden durch Cobl NT und Cobl NT + CT verzweigte *spines* mit auf 1,2% bzw. 1,1% erhöhter relativer Häufigkeit beobachtet.

Zusammenfassend kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass die allgemeine *spine*-Dichte, die vor allem durch das initiale Auswachsen von Protrusionen am Dendritenschaft bestimmt wird, nach *Cobl-knockdown* signifikant vermindert, nach Überexpression verschiedener Cobl-Konstrukte allerdings wenig verändert war. Dagegen wurde die durch das Ausmaß an Polymerisation linearer, unverzweigter Aktinfilamente determinierte *spine*-Länge sowohl durch Verminderung als auch durch Erhöhung der Cobl-Expression beeinflusst. Während der *Cobl-knockdown* mit kürzeren dendritischen *spines* einherging, führte die Überexpression der Aktin-nukleierenden Cobl-Fragmente Cobl CT sowie Cobl NT + CT konsistenterweise zu einer signifikanten Verlängerung von *spines*. Diese Effekte waren vor allem bei den langen-dünnen *spines* zu beobachten.

Die Effekte einer Überexpression des kompletten Cobl-Proteins waren aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht analysierbar, denn rekombinantes EGFP-Cobl 1-1337 zeigte nach Transfektion an Tag 10 in kultivierten primären hippocampalen Neuronen keine Expression.

7.5 Untersuchungen zur Expression und Funktion von Cobl im Kleinhirn

7.5.1 Analyse der Cobl-Expression

Im Rahmen der immunhistochemischen Studien zur cerebralen Cobl-Lokalisation wurde die Verteilung im Kleinhirn, einem Hirngewebe besonderer Struktur und Morphologie, genauer analysiert. In der Tat konnte in diesem Bereich, wie in Abb. 27 dargestellt ist, eine sehr hohe Cobl-Expression nachgewiesen werden. Während die unter Verwendung von anti-His^{ARA} und anti-His^{DBY} durchgeführten Kontrollen kein bzw. lediglich ein unspezifisches Signal durch die Hirnhäute zeigten (Abb. 27 A, C), detektierten beide eingesetzten anti-Cobl-Antikörper den Aktinnukleator sehr intensiv in cerebellären Purkinje-Zellen (Abb. 27 B, D). Dabei erfolgte nicht nur die Darstellung der Perikarien in der aus einer einzigen Zelllage bestehenden Purkinje-Zell-Schicht (P), sondern auch die weit verzweigten, in die Molekularschicht (M) ragenden Dendritenbäume der Purkinje-Zellen waren deutlich Cobl-positiv.

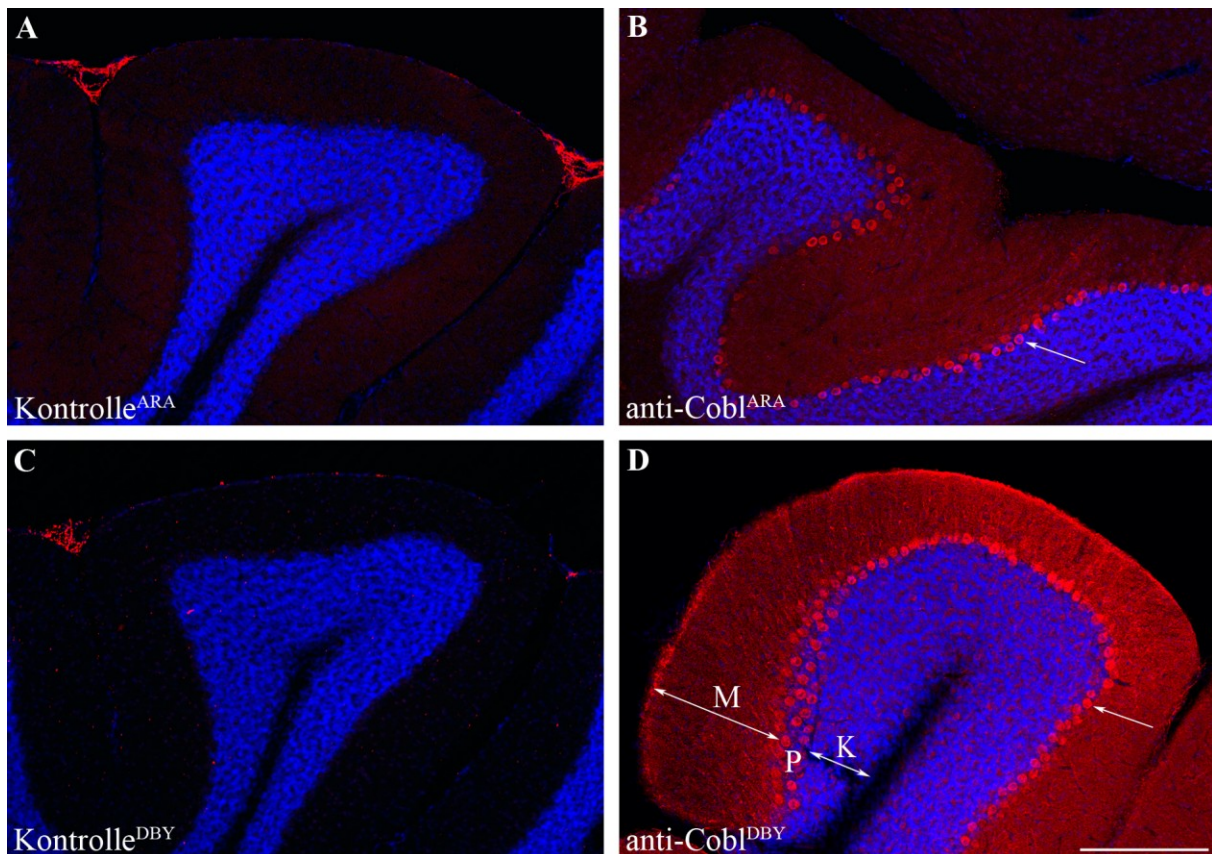


Abb. 27: Immunhistochemische Analyse der Cobl-Expression im Kleinhirn.

In 55 µm-dünnen sagittalen Hirnschnitten wiesen die Antikörper anti-Cobl^{ARA} (B) und anti-Cobl^{DBY} (D) den Aktinnukleator Cobl (rot) in der Purkinje-Zell-Schicht (P) nach (Pfeil). In der Molekularschicht (M) wurden die Dendritenbäume der Purkinje-Zellen angefärbt, während die Körnerzellschicht (K) nur schwach Cobl-positiv erschien (Doppelpfeile). Die Negativkontrollen nach Färbung durch anti-His^{ARA} (A) sowie anti-His^{DBY} (C) bestätigten das spezifisch detektierte Cobl-Signal. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) dargestellt. Der Balken in D entspricht 250 µm.

7.5.2 Funktionelle Analysen

Cobl-Funktionen sind vor allem in der Ausbildung des dendritischen Kompartimentes primärer hippocampaler Neuronen beschrieben (Ahuja et al. 2007). Da immunhistochemisch Cobl-Anreicherungen in cerebellären Purkinje-Zellen, das heißt Neuronen mit besonders ausgeprägter dendritischer Arborisierung, beobachtet wurden, schien es nahe liegend, dass Cobl auch in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns eine physiologische Rolle in der Neuromorphogenese erfüllt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Kleinhirnschnittkulturen mithilfe des Helios® *Gene Gun*-Systems mit den Plasmiden Cobl-RNAi (n = 30) sowie dem als Kontrolle dienenden, ausschließlich GFP-Expression treibenden RNAi-Vektor pRNAT-H1.1/Hygro (n = 23) transfiziert.

In cerebellären Purkinje-Zellen zeigte sich nach RNAi-vermitteltem *knockdown* endogenen Cobls eine deutliche Unterentwicklung des dendritischen Baumes im Vergleich zu Kontrollzellen, was beispielhaft an den Zellen in Abb. 28 deutlich wird.

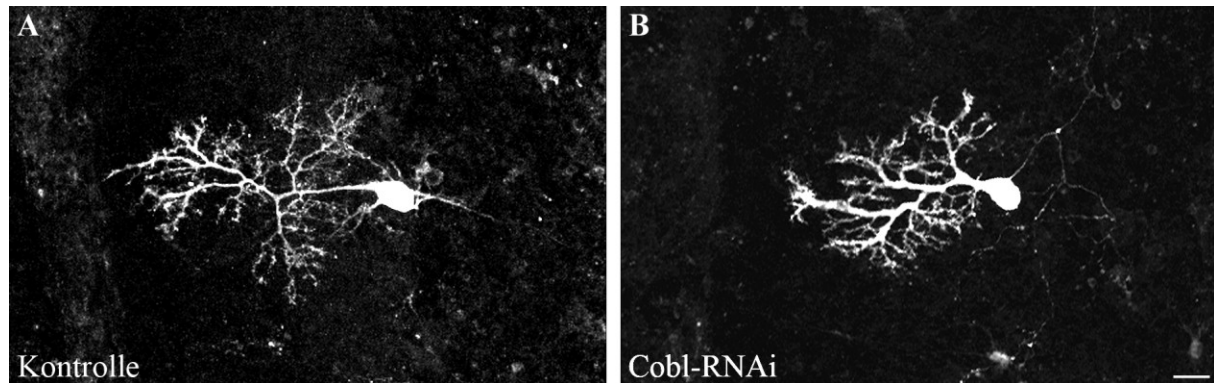


Abb. 28: Transfizierte Purkinje-Zelle einer cerebellären Schnittkultur.

Die Zellen in A und B zeigen das EGFP-Signal transfizierter Purkinje-Zellen aus Kleinhirnschnittkulturen nach Expression des Kontrollvektors pRNAT-H1.1/Hygro (A) bzw. nach *knockdown* von endogenem Cobl (B). Der Balken in B stellt 20 µm dar.

Die Ergebnisse der quantitativen morphologischen Auswertung sind in Abb. 29 dargestellt. Während die mittlere maximale Ausdehnung der Purkinje-Zellen unverändert blieb, zeigte sich nach RNAi-vermitteltem Cobl-*knockdown* der Trend zu einer Flächenreduktion (um 13,6%) im dendritischen Kompartiment.

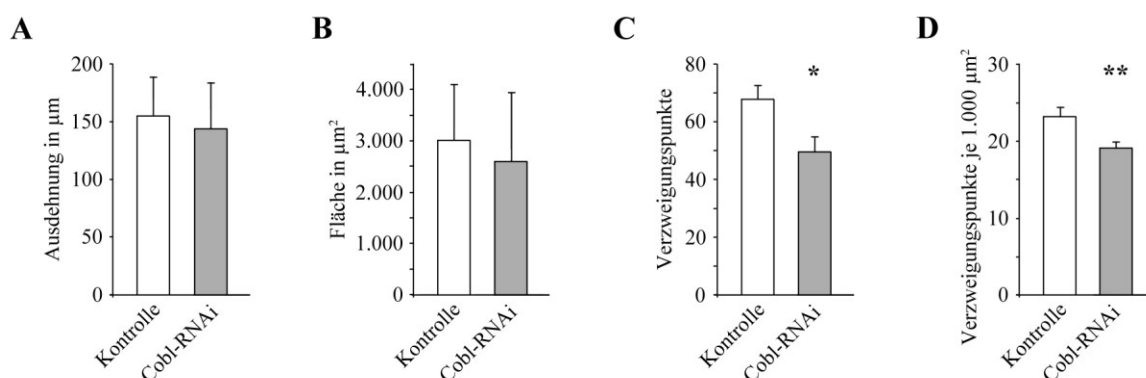


Abb. 29: Morphologische Analyse der Dendritenbäume von cerebellären Purkinje-Zellen nach RNAi-vermitteltem Cobl-*knockdown*.

Aus den Gehirnen 10 Tage junger Mäuse wurden organotypische Kleinhirnschnittkulturen angefertigt, mittels *Gene Gun* transfiziert und 42 h später fixiert. Bei RNAi-vermittelter verminderter Expression endogenen Cobls in cerebellären Purkinje-Zellen (n = 30) zeigten die Dendritenbäume eine unveränderte maximale Ausdehnung (A) sowie eine geringfügig verminderte Fläche (B) im Vergleich zu pRNAT-H1.1/Hygro-transfizierten Kontrollzellen (n = 23). Die absolute Anzahl an dendritischen Verzweigungspunkten einer Zelle sowie die Verzweigungspunkte je 1.000 µm² Fläche waren nach Cobl-*knockdown* signifikant erniedrigt. Die Daten sind als Mittelwerte und Standardabweichung (A, B) bzw. als Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (C, D) dargestellt und wurden in einem zweiseitigen, ungepaarten t-Test gegen die Kontrolle getestet (***) $p < 0,001$; ** $0,001 \leq p < 0,01$; * $0,01 \leq p < 0,05$).

Eine verminderte Cobl-Expression führte außerdem zu einer signifikanten ($p = 0,016$) Verringerung der absoluten Anzahl an dendritischen Verzweigungspunkten der Purkinje-Zellen um 26,6% im Vergleich zur Kontrolle. Die relative Anzahl der dendritischen Verzweigungspunkte pro $1000 \mu\text{m}^2$ Fläche, ein Maß für den Intensitätsgrad dendritischer Arborisierung, war nach Cobl-*knockdown* signifikant ($p = 0,005$) um 17,3% erniedrigt.

Damit wurde deutlich, dass Cobl eine kritische Rolle in der Ausbildung des elaborierten dendritischen Baumes von cerebellären Purkinje-Zellen erfüllt, einer wesentlichen Voraussetzung für komplexe Signaltransduktions- und -integrationsprozesse im Kleinhirn.

7.6 Analyse der Cobl-Expression in nicht-neuronalen Geweben

Nachdem Western Blot-Analysen verschiedener Gewebehomogenate aus der Ratte ein Cobl-Signal nicht nur im Gehirn, sondern auch in den nicht-neuronalen Organen Hoden, Lunge und Milz detektiert hatten (Ahuja et al. 2007), wurden die genannten Organe im Rahmen dieser Arbeit immunhistochemisch analysiert, um weitere Einblicke in die zelltypspezifische und ggf. auch subzelluläre Lokalisation des Aktinnukleators zu gewinnen. Zusätzlich wurde auch die Bauchspeicheldrüse in die Analysen einbezogen, denn diese ist als endo- und exokrin aktive Drüse ein Organ hoher (kompensatorischer) Endocytoseaktivität. Da den beiden bisher bekannten Cobl-Interaktionspartnern Abp1 und Syndapin I funktionelle Bedeutung im Rahmen dieser Prozesse zugesprochen wurde (Abp1: Kessels et al. 2001, Mise-Omata et al. 2003, Connert et al. 2006; Syndapin I: Qualmann et al. 2000, Kessels und Qualmann 2002, Anggono et al. 2006, Kessels et al. 2006, Kessels und Qualmann 2006, Koch 2009 [Dissertation]), erschien es möglich, dass auch der Aktinnukleator Cobl von funktioneller Bedeutung in den entsprechenden Zellen sein könnte, weshalb im Rahmen dieser Arbeit eine entsprechende Lokalisationsanalyse durchgeführt wurde.

7.6.1 Hoden

Wie aus Abb. 30 ersichtlich wird, konnte eine Cobl-Expression im Hoden sowohl unter Verwendung von anti-Cobl^{ARA} (B) als auch mittels anti-Cobl^{DBY} (D) nachgewiesen werden. Die Intensität des detektierten Cobl-Signals im Vergleich zur Kontrolle (A bzw. C) unterschied sich jedoch und war nach Immunfluoreszenzfärbung durch anti-Cobl^{DBY} höher. Beide verwendete Kontroll-Antikörper-Färbungen zeigten ein Signal im interstitiellen

Gewebe zwischen den Hodenkanälchen. Dieses war als unspezifisch anzusehen, denn auch in weiteren Kontrollfärbungen mit Kontroll-Immunglobulinen anstelle des primären Antikörpers wurde dieses Phänomen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

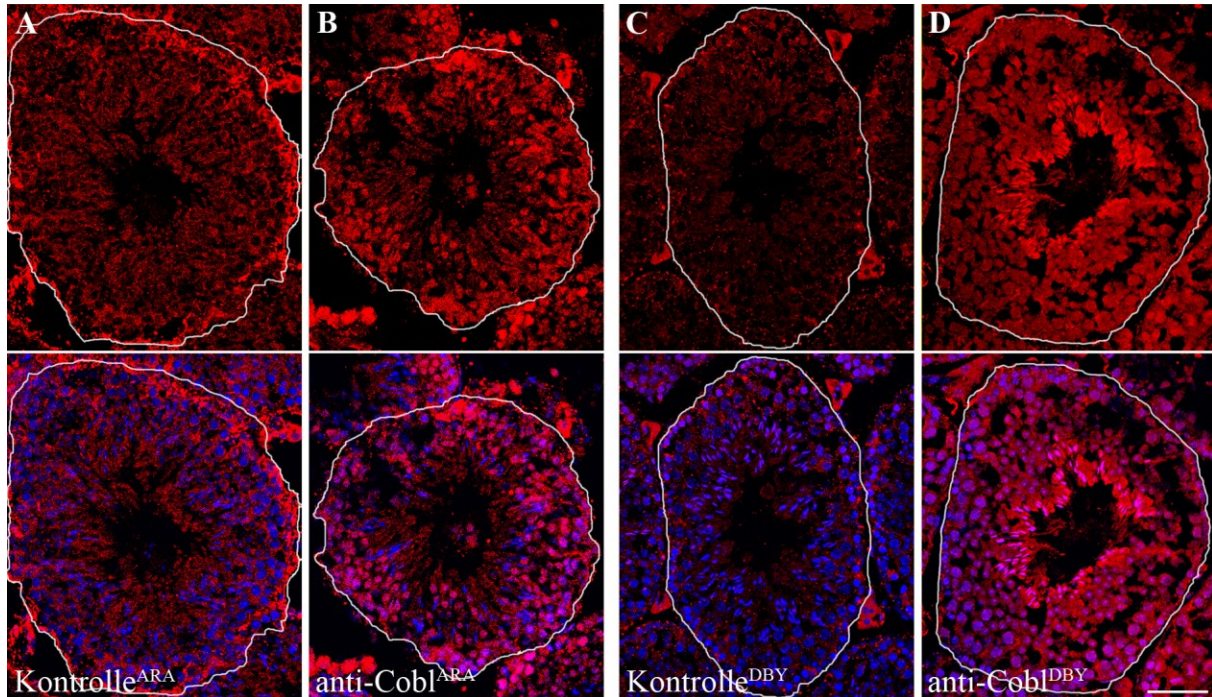


Abb. 30: Immunhistochemische Detektion der Expression von Cobl im Hoden.

Die Abbildungen der oberen Reihe zeigen in quer angeschnittenen Tubuli seminiferi (umrandet) des Hodens das durch anti-Cobl^{ARA} (B), anti-Cobl^{DBY} (D) bzw. Kontroll-Antikörper (A, C) vermittelte Fluoreszenzsignal (rot), während in der unteren Reihe jeweils für die gleiche Abbildung das DAPI-Signal (blau) hinzugefügt ist. Beide anti-Cobl-Antikörper wiesen Cobl im Hoden nach, detektierten aber unterschiedliche Lokalisationen. Der Balken in D zeigt 75 µm.

Bei Betrachtung des DAPI-Signals der Zellkerne wurde deutlich, dass alle vier angeschnittenen Bereiche der Tubuli seminiferi funktionell etwa dieselben Stadium der Spermatogenese repräsentierten und damit vergleichbar sein sollten.

Im histologischen Schnitt der Tubuli seminiferi (Hodenkanälchen) des Hodens detektierten die eingesetzten anti-Cobl-Antikörper eine unterschiedliche Lokalisation des Aktinnukleators. Das durch anti-Cobl^{ARA} vermittelte Signal war eher im basalen Keimepithel und dort in Kolokalisation mit dem DAPI-Signal zu finden. Es wies damit auf eine nukleäre und auch perinukleäre Cobl-Expression in Spermatogonien sowie Spermatocyten I hin. Durch anti-Cobl^{DBY} markiertes Cobl kam dagegen in homogener Verteilung im Keimepithel, mit Anreicherung apikal, im Kompartiment der ausreifenden, noch durch Cytoplasmabrücken verbundenen Spermatiden, vor und auch alle Zellkerne waren Cobl-positiv.

7.6.2 Milz

Auch in der Milz wurde die im Western Blot detektierte Cobl-Expression immunhistochemisch genauer charakterisiert. Die Ergebnisse nach konfokaler Mikroskopie sind in Abb. 31 dargestellt.

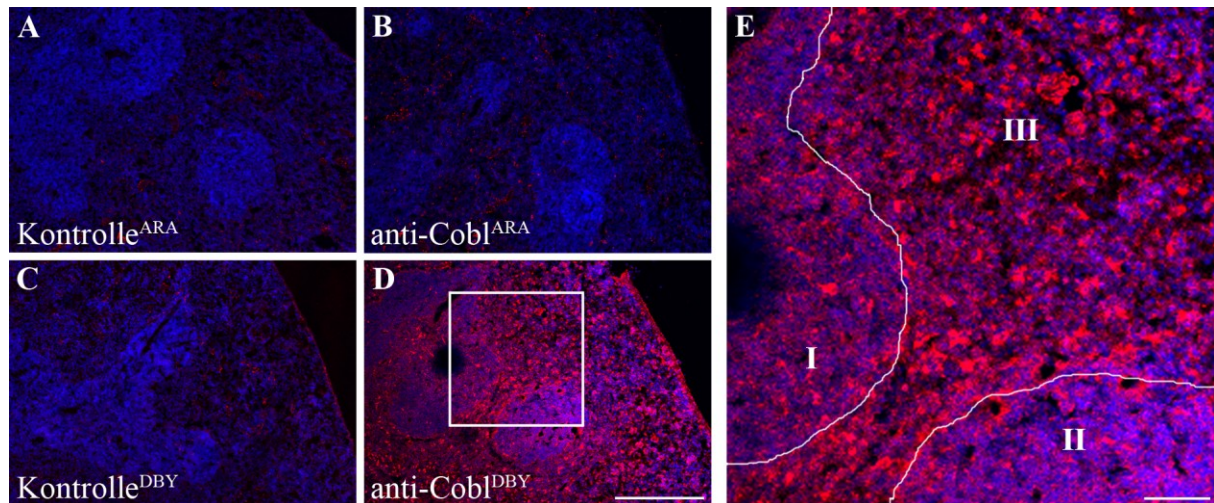


Abb. 31: Immunhistochemische Analyse der Cobl-Expression in der Milz.

Nur der anti-Cobl^{DBY}-Antikörper wies Cobl (rot) spezifisch in der Milz nach (D). anti-Cobl^{ARA} (B) lieferte in der Verdünnung von 1:50 kein stärkeres Fluoreszenzsignal als die Kontrollen (A, C). Der in D markierte Ausschnitt ist in E vergrößert dargestellt. Zur Darstellung der typischen Architektur des Milzgewebes wurde das DAPI-Signal (blau) der Zellkerne herangezogen, das aufgrund der Zelldichte und Struktur des Gewebes dessen Differenzierung in periarterielle Lymphocytenscheide (weiße Milzpulpa, I), Milzknötchen (weiße Milzpulpa, II) sowie rote Milzpulpa (III) ermöglichte. Der Balken zeigt 250 μ m in D und 50 μ m in E.

Anti-Cobl^{DBY} detektierte den Aktinnukleator Cobl spezifisch (Abb. 31 D) in der Milz. Die Vergrößerung (E) des Ausschnittes aus D zeigt eine Lokalisation von Cobl in den Fibroblasten der roten Milzpulpa (III). Auch in der Lymphocyten-reichen weißen Milzpulpa, das heißt der periarteriellen Lymphocytenscheide (I) sowie den Milzknötchen (II), konnte Cobl nachgewiesen werden. Nach anti-Cobl^{ARA}-Färbung lag das Immunfluoreszenzsignal hingegen auf Kontrollniveau und ermöglichte damit keinen Cobl-Nachweis (Abb. 31 A, B).

7.6.3 Pankreas

Zusätzlich zu den im Western Blot positiv auf Cobl getesteten Organen sollte das Pankreas (Bauchspeicheldrüse) als exemplarischer Vertreter der exokrinen Drüsen in die immunhistochemischen Analysen zur Expression einbezogen werden. Abb. 32 A-D zeigt das Ergebnis des Cobl-Nachweises in endo- und exokrinem Pankreasgewebe. In der Tat detektierte anti-Cobl^{DBY} den Aktinnukleator spezifisch in den endokrinen Langerhans-Inseln des Pankreas (D). Im exokrinen Pankreas konnte Cobl hingegen nicht spezifisch

nachgewiesen werden. Die Immunfluoreszenz-Färbung unter Einsatz von anti-Cobl^{ARA} (B) lieferte ähnlich den Kontrollen (A, C) kein Signal.

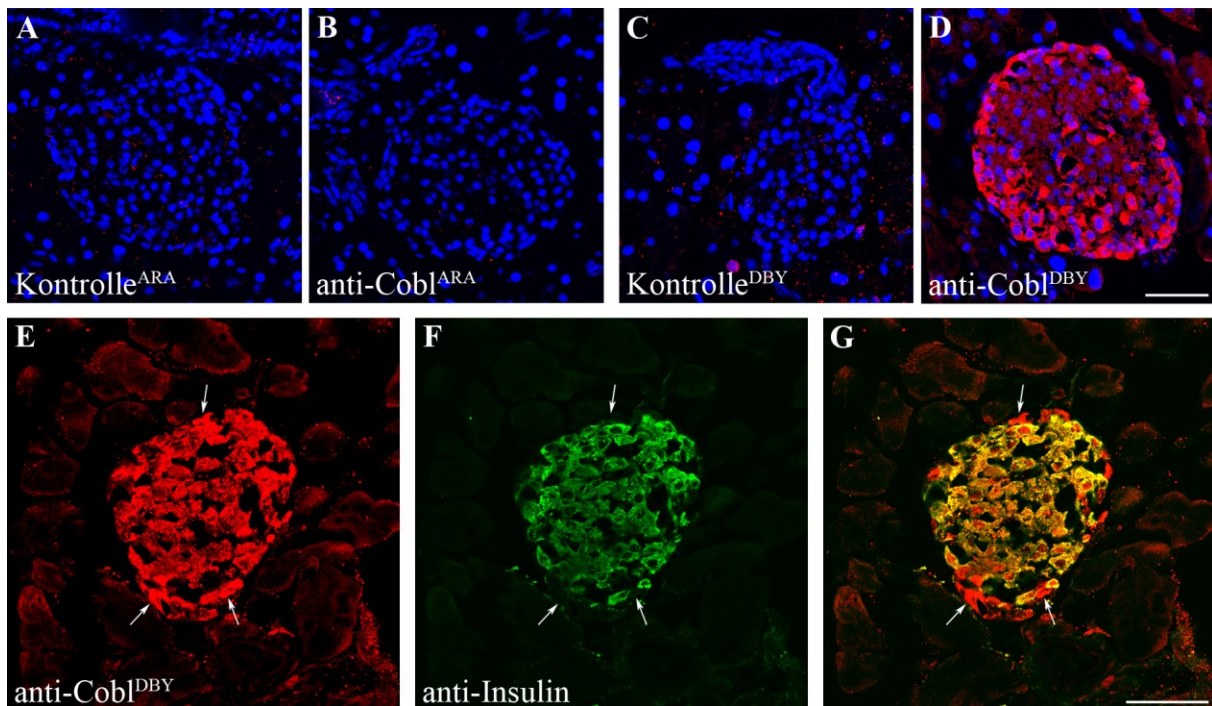


Abb. 32: Immunhistochemische Analyse der Cobl-Expression im Pankreas.

Anti-Cobl^{DBY} detektierte den Aktinnukleator Cobl spezifisch in den Langerhans-Inseln des Pankreas (D, rot), während der Antikörper anti-Cobl^{ARA} (B) lediglich ein Signal auf Kontrollniveau lieferte (A, C). Zur genaueren Charakterisierung des Cobl-exprimierenden Zelltyps zeigen die Abbildungen E-G Kolokalisationsuntersuchungen von Cobl (E, G, rot) und Insulin (F, G, grün). Cobl war in den Insulin-sekretierenden β -Zellen lokalisiert und konnte nach Überlagerung der Fluoreszenzsignale (G) auch in einzelnen Insulin-negativen Zellen nachgewiesen werden (Pfeile). Die Darstellung der Zellkerne in A-D erfolgte mittels DAPI (blau). Die Balken in D und G zeigen je 50 μ m.

Der Cobl-exprimierende Zelltyp in den Langerhans-Inseln wurde mittels Immunfluoreszenzanalyse von Kofärbungen von Pankreas-Schnitten unter Verwendung von anti-Cobl^{DBY}- sowie anti-Insulin-Antikörpern bestimmt (siehe Abb. 32 E-G). Die Überlagerung der durch die Antikörper vermittelten Signale zeigte, dass Insulin-bildende Zellen in den Langerhans-Inseln auch den Aktinnukleator Cobl exprimierten, was als Beleg für die Cobl-Lokalisation in den β -Zellen angesehen werden konnte. Während Insulin cytosolisch lokalisiert war und das Immunfluoreszenzsignal die Zellkerne aussparte, war Cobl auch nukleär exprimiert. Weiterhin konnte Cobl in einzelnen Insulin-negativen, randständigen Zellen der pankreatischen Langerhans-Inseln nachgewiesen werden (Abb. 32 E-G, Pfeile).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen zeigten damit eine spezifische nicht-neuronale Cobl-Lokalisation in einzelnen Kompartimenten bzw. Zelltypen von Hoden und Milz. In der erstmalig in die Untersuchungen

einbezogenen Bauchspeicheldrüse wurde Cobl in den endokrinen Zellen der Langerhans-Inseln detektiert. Diese Lokalisationsuntersuchungen deuten damit auf eine physiologische Funktion des Aktinnukleators Cobl auch in nicht-neuronalen Zellen hin.

7.7 Analysen zur Kolokalisation von Cobl und seinen Interaktionspartnern Abp1 und Syndapin I

Die immunhistochemischen Analysen zur endogenen Lokalisation von Cobl sowohl in neuronalen als auch in nicht-neuronalen Geweben gaben erste Hinweise auf die physiologische Bedeutung dieses Aktinnukleators. Zur weiteren Aufklärung der Cobl-beinhaltenen Signaltransduktionsmaschinerie zum Aktincytoskelett *in vivo* wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zur Kolokalisation von Cobl und dessen Interaktionspartnern Abp1 und Syndapin I durchgeführt, die eine Voraussetzung für deren funktionelles Zusammenspiel ist. Dazu erfolgte zunächst die erfolgreiche Etablierung immunhistochemischer Färbungen gegen Abp1 und Syndapin I, wobei Gewebeschnitte entsprechender *knockout*-Tiere als Negativkontrolle im Vergleich zu wildtypischen Schnitten eingesetzt wurden (Daten nicht gezeigt).

Im Hippocampus wurde neben einer hohen Cobl-Expression auch eine starke Immunreaktivität von Abp1 deutlich (Abb. 33). Eine Kolokalisation der beiden Proteine zeigte sich vor allem im Bereich der Dendriten.

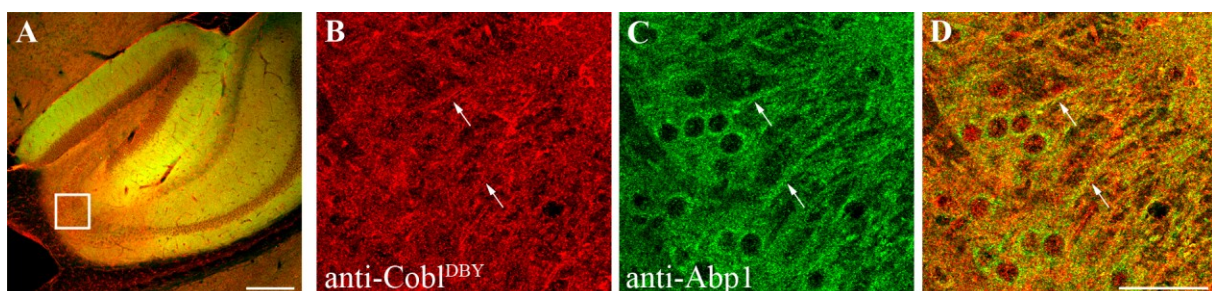


Abb. 33: Kolokalisationsanalyse von Cobl und Abp1 im Hippocampus nach immunhistochemischer Färbung von Gehirnschnitten.

Immunhistochemische Färbungen sagittaler Gehirnschnitte von 12 Wochen alten Mäusen zeigten, dass sowohl Cobl (A, B, D, rot) als auch Abp1 (A, C, D, grün) in hippocampalen Neuronen exprimiert werden. In einem aus A vergrößerten Ausschnitt ist insbesondere im Dendritenbaum (Pfeil) hippocampaler Pyramidenzellen eine deutliche Überlagerung (D, gelb) der Fluoreszenzsignale nach Immunfärbung mit anti-Cobl^{DBY} und anti-Abp1 erkennbar. Der Balken zeigt 250 µm (A) bzw. 50 µm (D).

Im Gegensatz zu Abp1 wurde Cobl nicht nur in den Perikarien, sondern auch in den Zellkernen der Pyramidenzellen lokalisiert. Ein aus Abb. 33 A vergrößerter Ausschnitt aus dem CA3-Bereich zeigt die Cobl-Expression in hippocampalen Pyramidenzellen, die im Kern etwas schwächer als im Rest der Zellen zu beobachten war. Anti-Abp1 lieferte im Vergleich dazu ein distinkteres Muster mit Anreicherungen direkt perinukleär sowie im Dendritenbaum.

Parallele Untersuchungen wiesen ebenfalls eine Kolokalisation von Cobl und Syndapin I nach (Abb. 34).

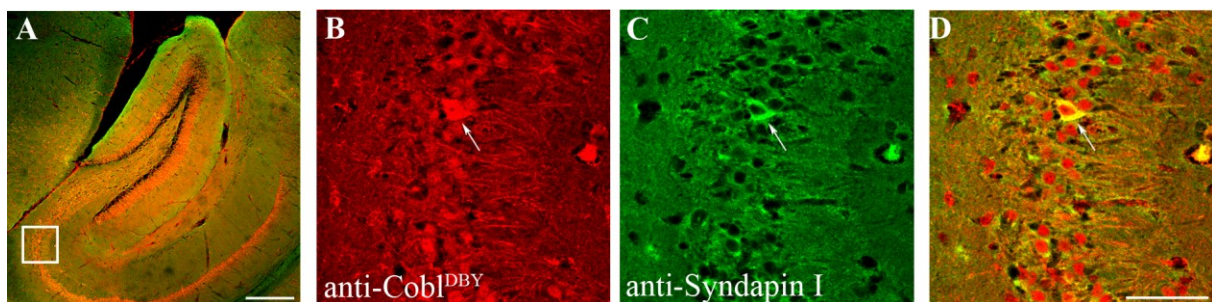


Abb. 34: Kolokalisationsanalyse von Cobl und Syndapin I im Hippocampus nach immunhistochemischer Färbung von Gehirnschnitten.

Die Immunfluoreszenzanalyse von Gehirnschnitten adulter Mäuse nach Koimmunfärbung gegen Cobl (A, B, D, rot) und Syndapin I (A, C, D, grün) verdeutlichte die Überlagerung (D, gelb) der Immunreaktivität der Proteine in Perikaryon und Dendritenbaum hippocampaler Pyramidenzellen. Eine in der Schnittebene liegende Pyramidenzelle ist durch einen Pfeil in dem aus A vergrößerten Bereich in B, C und D markiert. Der Balken zeigt 250 μm (A) bzw. 50 μm (D).

In den dargestellten konfokalen Aufnahmen liegt eine hippocampale Pyramidenzelle aus der Region CA3 in der Ebene, wodurch die Cobl-Syndapin I-Kolokalisation besonders deutlich hervortritt. Während Cobl in der gesamten hippocampalen Pyramidenzelle zu finden war, sparte das Syndapin I-Signal den Zellkern aus und war vor allem im Dendritenbaum sowie dem Perikaryon nachweisbar.

Im cerebralen Cortex, in dem immunhistochemisch eine hohe Cobl-Expression nachgewiesen wurde (Abb. 15), zeigte sich im Immunfluoreszenzsignal nach Färbung mit anti-Abp1- und anti-Syndapin I-Antikörpern ein ähnliches, homogenes Verteilungsmuster, wobei im gesamten Gewebe Kolokalisationen mit dem Aktinnukleator Cobl zu beobachten waren (Daten nicht gezeigt).

Die Kolokalisationen von Cobl und Abp1 sowie Cobl und Syndapin I wurden weiterhin immunhistochemisch im Kleinhirn analysiert (Abb. 35).

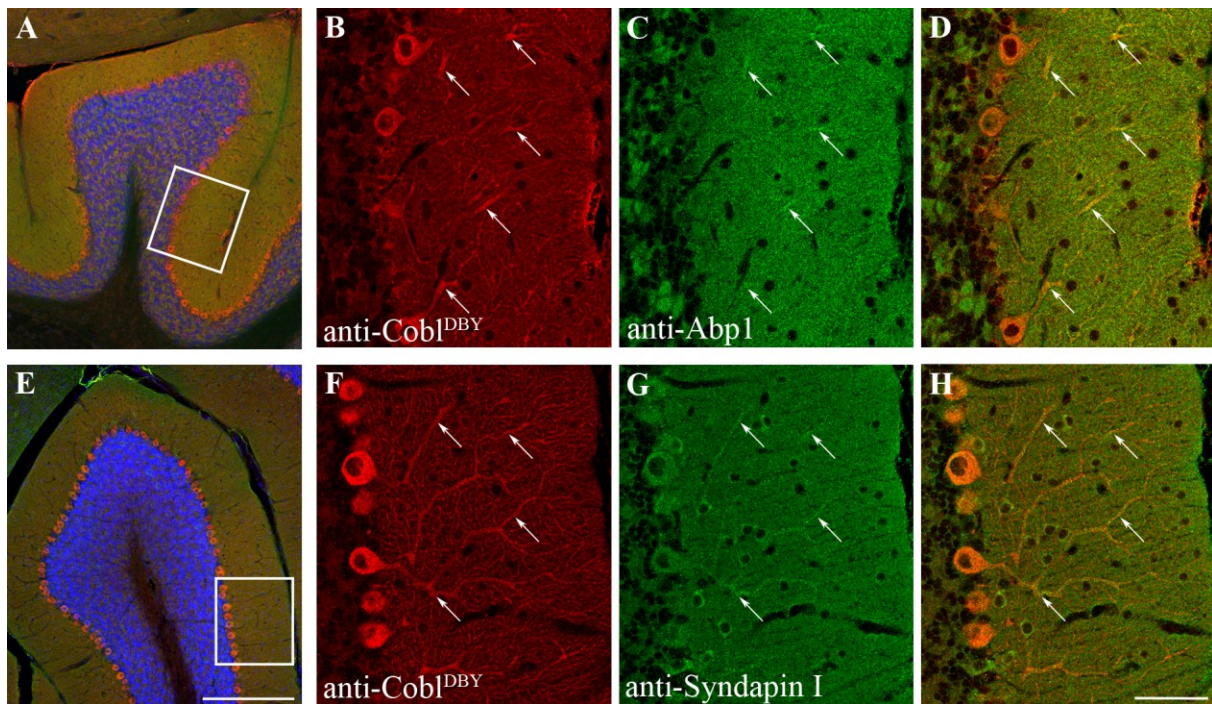


Abb. 35: Kolokalisationsstudien zur endogenen Lokalisation von Cobl und Abp1 (A-D) bzw. Cobl und Syndapin I (E-H) im Kleinhirn.

55 µm-dünne Kleinhirnschnitte wurden immunhistochemisch gegen Cobl und Abp1 bzw. Syndapin I gefärbt. A und E zeigen die Überlagerung von DAPI (blau)- und Antikörper-vermittelten Signalen in der Übersicht, während B-D sowie F-H den in A bzw. E markierten Ausschnitt vergrößern. Die Immunfluoreszenzsignale von Cobl (A, B, D, E, F, H, rot) und Abp1 (A, C, D, grün) bzw. Syndapin I (E, G, H, grün) wurden in D bzw. H überlagert. Cobl wurde hoch exprimiert in den Purkinje-Zellen detektiert und kolokalisierte dort mit Abp1 und Syndapin I (Pfeile). Der Balken zeigt 250 µm (E) bzw. 50 µm (H) an.

Während die Cobl-Expression vorwiegend in den cerebellaren Purkinje-Zellen detektiert wurde, zeigten dessen Interaktionspartner Abp1 und Syndapin I eine homogene Verteilung im gesamten Gewebeschnitt. Nichtsdestotrotz verdeutlichen die aus Abb. 35 A und E vergrößerten Ausschnitte (B-D bzw. F-H) eine deutliche Kolokalisation der jeweiligen Proteine in Purkinje-Zellen sowohl im Perikaryon (Purkinje-Zell-Schicht) als auch in den angeschnittenen Bereichen des Dendritenbaumes in der Molekularschicht (Abb. 35 D, H, Pfeile).

In Gewebeschnitten aus dem Hoden zeigte sich nach Immunfluoreszenzfärbung eine Expression des Cobl-Interaktionspartners Abp1 im Keimepithel. Das Ergebnis anschließender Kolokalisationsuntersuchungen von Cobl und Abp1 ist in Abb. 36 repräsentativ dargestellt. Abp1 ist im Cytosol hoch exprimiert, wobei vor allem im apikalen Keimepithel lokalisierte Spermatocyten II eine Abp1-Anreicherung zeigten. Das Immunfluoreszenzsignal sparte die Zellkerne deutlich aus. Im Bereich der Spermatocyten wurde eine Kolokalisation (Abb. 36 D, E, gelb) der beiden untersuchten cytoskelettalen Komponenten deutlich. Zusätzlich zu einer

perinukleär cytosolischen Immunreaktivität kolokalisierte Cobl mit DAPI, dem verwendeten Marker für Zellkerne.

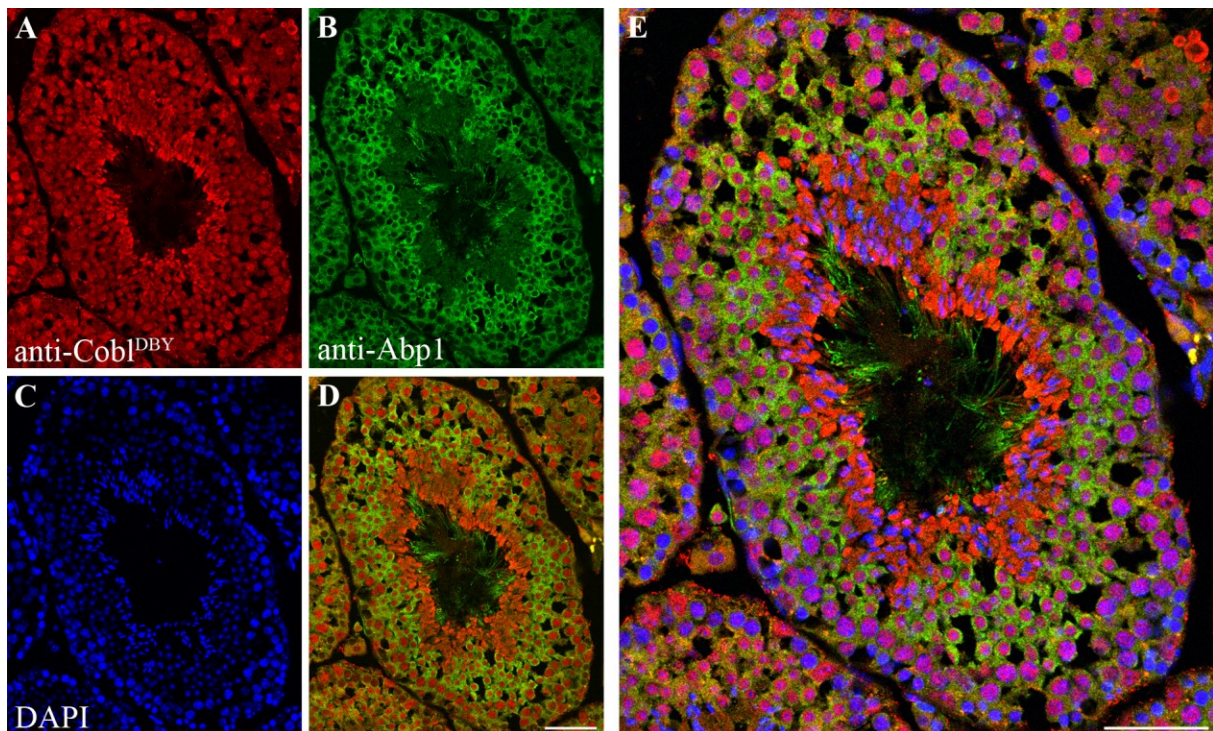


Abb. 36: Immunhistochemische Kolokalisationsuntersuchung zur Expression von Cobl und Abp1 im Hoden.

An Gewebenschnitten des Hodens 12 Wochen alter Mäuse wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Das durch anti-Cobl^{DBY} (A, D, E, rot) und anti-Abp1 (B, D, E, grün) vermittelte sowie das DAPI-Signal (C, E, blau) wurden in E überlagert und vergrößert dargestellt. D bildet Cobl und Abp1 gemeinsam ohne Zellkernfärbung ab. Die Balken in D und E zeigen 75 µm.

Der auf Proteinebene mit Cobl interagierende Bindungspartner Syndapin I konnte im Rahmen der durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen nicht im Hoden nachgewiesen werden.

Sowohl für Cobl (Ahuja et al. 2007) als auch für Abp1 (Connert et al. 2006) ist in der Literatur eine Expression in der Milz beschrieben. Das in Abb. 37 dargestellte Ergebnis der konfokalen Mikroskopie zeigt die Lokalisation von endogenem Cobl (A, rot) sowie Abp1 (B, grün) nach immunhistochemischer Färbung. Es wurde deutlich, dass die Interaktionspartner auf zellulärer Ebene in der Milz kolokalisieren, auch wenn die Bereiche stärkster Expression für beide Proteine in unterschiedlichen Kompartimenten zu beobachten waren.

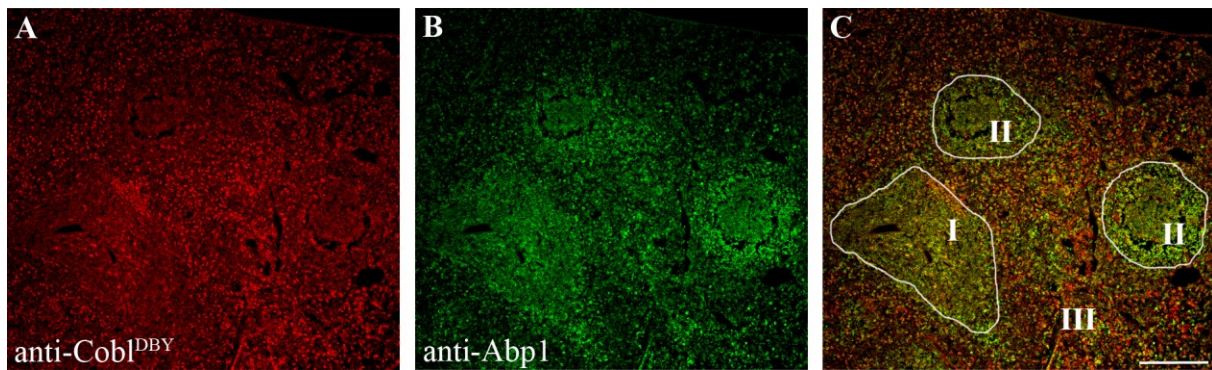


Abb. 37: Immunhistochemische Untersuchung zur Kolokalisation von Cobl und Abp1 in der Milz.

Nach immunhistochemischer Färbung von Gewebeschnitten aus der Milz 12 Wochen aller Mäuse konnten Cobl (A, C, rot) und Abp1 (B, C, grün) in der Milz dargestellt werden. Anhand der Überlagerung (C) wurde deutlich, dass Abp1 vor allem in der weißen Milzpulpa (I periarterielle Lymphocytscheide, II Milzknötchen) exprimiert war, während Cobl vielmehr angereichert in der roten Milzpulpa (III) vorkam. Der Balken entspricht 100 μ m.

Abp1 konnte in besonderem Maße in periarteriellen Lymphocytscheiden (Abb. 37, I) sowie Milzknötchen (Abb. 37, II), das heißt in T- bzw. B-Lymphocyten-reichen Regionen der Milz, nachgewiesen werden. Cobl ließ sich dort ebenfalls detektieren, wurde jedoch vor allem im Bereich der roten Milzpulpa (Abb. 37, III) exprimiert.

Syndapin I wurde in der Milz nicht detektiert.

Auch im Pankreas zeigten die durchgeführten immunhistochemischen Doppelfärbungen für die Cobl-Lokalisation im Zusammenhang mit dessen Interaktionspartnern Abp1 und Syndapin I eine deutliche zelluläre und subzelluläre Kolokalisation. Abb. 38 verdeutlicht, dass sowohl Abp1 als auch Syndapin I in exakt den gleichen Zellen wie auch der Aktinnukleator Cobl cytosolisch exprimiert werden. Während das nach Färbung mittels anti-Abp1- und anti-Syndapin I-Antikörpern detektierte Signal die Zellkerne deutlich aussparte, war Cobl in jedem Fall auch nukleär lokalisiert. Weiterhin wurden, wie in Abb. 38 B, C dargestellt ist, nur für Abp1-positive Strukturen beobachtet, in denen sich aufgrund der Morphologie Kapillarendothel vermuten ließ. Die definitive Identifizierung dieser eindeutig nicht Cobl-exprimierenden Strukturen musste im Rahmen dieser Untersuchungen jedoch offen gelassen werden.

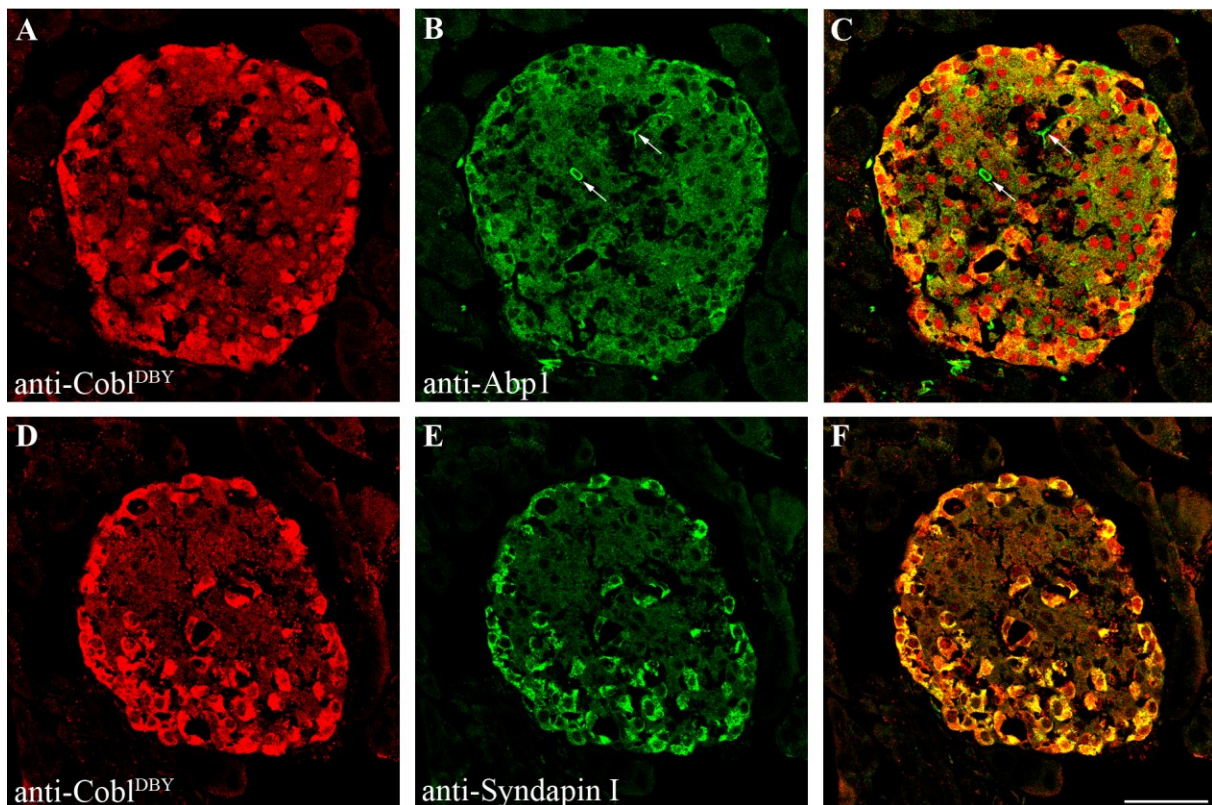


Abb. 38: Immunhistochemische Kolokalisationsanalyse von Cobl und seinen Interaktionspartnern Abp1 bzw. Syndapin I im Pankreas.

Gewebeschnitte des Pankreas 12 Wochen alter Mäuse wurden immunhistochemisch untersucht. Cobl kolokalisierte im Cytosol der endokrinen Zellen der Langerhans-Inseln sowohl mit Abp1 (A-C) als auch mit Syndapin I (D-F). Die Überlagerungen der Fluoreszenzsignale (C, F) zeigen, dass Cobl (A, C, D, F, rot) im Gegensatz zu Abp1 (B, C, grün) und Syndapin I (E, F, grün) zusätzlich im Kern dieser Zellen lokalisiert war. Der Balken zeigt 50 μm .

Nach Durchführung komplexer immunhistochemischer Analysen lässt sich zusammenfassend feststellen, dass der Aktinnukleator Cobl *in vivo* sowohl mit Abp1 als auch mit Syndapin I kolokalisierte. Der bisher vor allem in neuronalen Geweben beschriebene Cobl-Interaktionspartner Syndapin I kolokalisierte mit dem Aktinnukleator in Cortex cerebri, Hippocampus und Kleinhirn. In den Langerhans-Inseln des Pankreas wurden sowohl die Syndapin I-Expression als auch dessen Kolokalisation mit Cobl nachgewiesen. Das mit Cobl interagierende Protein Abp1 kolokalisierte mit Cobl nicht nur in den eben genannten Strukturen, sondern (im Gegensatz zu Syndapin I) auch in Hoden und Milz. Bisher waren die Interaktionen Cobl/Abp1 und Cobl/Syndapin I biochemisch auf Proteinebene charakterisiert worden. Die hier nachgewiesenen positiven Kolokalisationen *in vivo* geben einen zusätzlichen Hinweis auf die physiologische Relevanz der Proteininteraktionen. Weiterhin zeigten Cobl im Zellkern und Abp1 in kapillären Strukturen selektive Expressionsmuster, die auf weitere, voneinander unabhängige Funktionen der beiden Proteine hindeuten.

8 DISKUSSION

8.1 Die Rolle von Cobl-vermittelter Aktinnukleation in der Neuromorphogenese

Der erst kürzlich identifizierte Aktinnukleator Cordon-Bleu (Cobl) vermittelt die Bildung eines trimeren Aktinkeimes, an dem die weitere Polymerisation zu linearen, unverzweigten Aktinfilamenten spontan ablaufen kann (Ahuja et al. 2007). Immunhistochemische Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit verdeutlichten die hohe Cobl-Expression in neuronalen Geweben, spezifizierten diese vor allem auf corticale und hippocampale Pyramidenzellen sowie die Purkinje-Zellen im Kleinhirn und legten damit eine Bedeutung von Cobl für Struktur und/oder Funktionalität dieser Zelltypen nahe.

Im Cortex cerebri wurde durch beide, gegen zwei distinkte Cobl-Molekülbereiche gerichtete anti-Cobl-Antikörper vermittelt eine hohe Cobl-Expression detektiert. Die homogene, intensive Anfärbung des gesamten Gewebes durch anti-Cobl^{DBY} im Vergleich zur schwächeren selektiven Hervorhebung einzelner laminär angeordneter Pyramidenzellen nach anti-Cobl^{ARA}-Färbung lässt sich vor allem durch mögliche Unterschiede in der Zugänglichkeit der Epitope für die einzelnen Antikörper erklären. So könnten zum Beispiel Epitope durch in diesem Bereich bindende Interaktionspartner von Cobl oder Paraformaldehyd-induzierte Protein-quervernetzungen maskiert werden und damit eine verminderte Cobl-Immunreaktivität bewirkt werden. Da das Epitop von anti-Cobl^{ARA} in allen bisher beschriebenen Cobl-Spleißvarianten (Kapitel 7.1.1, Abb. 8) vorhanden ist, erscheint es unwahrscheinlich, dass das im Vergleich zu anti-Cobl^{DBY} verminderte Immunfluoreszenzsignal auf die Detektion unterschiedlicher Spleißvarianten zurückzuführen ist. Anti-Cobl^{DBY} erkannte ausschließlich die WH2-Domänen beinhaltenden langen Cobl-Varianten. Unabhängig von der Signalintensität ist festzuhalten, dass Cobl in den corticalen Pyramidenzellen und damit in denjenigen zellulären Strukturen hoch exprimiert ist, die Bewusstsein, kognitive Fähigkeiten und Persönlichkeit eines Organismus ermöglichen. Die aktuellen Immunhistochemie-Ergebnisse bestätigten damit den proteinbiochemischen Nachweis von Cobl in Rattenhirnhomogenat (Ahuja et al. 2007). Auch die Beobachtungen von Gasca et al. (1995) und Carroll et al. (2003), die eine Cobl-Expression auf mRNA-Ebene im Zusammenhang mit der embryonalen Entwicklung des Neuralrohrs beschrieben, sind dazu konsistent.

Kultivierte corticale Neuronen exprimierten Cobl sowohl im Soma als auch in den Neuriten und zeigten unabhängig von der Fixierungsmethode je nach verwendetem Antikörper Unterschiede im Lokalisationsmuster. Anti-Cobl^{DBY} indizierte insbesondere eine cytosolische Lokalisation des Aktin-nukleierenden Proteins, während anti-Cobl^{ARA}, der Antikörper, dessen Epitop auch in den kurzen Cobl-Spleißvarianten enthalten ist (Abb. 8), ein zusätzliches Signal im Bereich der Zellmembran lieferte. Damit scheinen die Cobl-Varianten, welche nicht den WH2-Domänen-tragenden C-Terminus wohl aber die Bindungsstellen für Abp1 und Syndapin I enthalten, direkt an der Zellmembran lokalisiert zu sein. Dieses Phänomen könnte möglicherweise durch direkte Interaktionen mit den membranbindenden Proteinen Abp1 und/oder Syndapin I (Dharmalingam et al. 2009, Dharmalingam 2009 [Dissertation]) vermittelt werden und von funktioneller Bedeutung sein, in dem Cobl zum Beispiel weitere, bisher unbekannte Cobl-Interaktionspartner zur Zellmembran rekrutiert.

Immunhistochemische Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ergaben, dass Cobl auch in den dicht gelagerten Pyramidenzellen in den Regionen Gyrus dentatus, CA3, CA2 und CA1 des Hippocampus hoch exprimiert ist. Kultivierte primäre hippocampale Neuronen sind das System der Wahl zur experimentellen Untersuchung von neuronaler Morphogenese und Plastizität, denn sie bilden charakteristische Verzweigungen ganz ähnlich den *in vivo* reifenden hippocampalen Pyramidenzellen, die sich in besonderem Maße durch ihre komplexe Morphologie sowie dynamische Struktur auszeichnen (Banker und Cowan 1977, Banker und Cowan 1979).

Bisherige Analysen von Ahuja et al. (2007) wiesen Cobl in dissoziierten primären hippocampalen Neuronen nach und charakterisierten diesen Aktinnukleator als unabdingbar für die frühe neuronale Morphogenese sowie dendritische Arborisierung. Nach Überexpression von Cobl an Tag 5 in Kultur und Fixierung 48 h später zeigten primäre hippocampale Neurone einen deutlich höheren Verzweigungsgrad von Axon und Dendriten. Neurone mit erhöhter Cobl-Expression zeichneten sich durch mehr Dendriten aus, die jedoch eine kürzere Länge aufwiesen als in entsprechenden Kontrollzellen. RNAi-vermittelter Cobl-*knockdown* bestätigte konsistenterweise die funktionelle Relevanz des Aktinnukleators für Prozesse der neuronalen Morphogenese, insbesondere im Bereich des Dendritenbaumes (Ahuja et al. 2007).

Im dendritischen Kompartiment beobachtet man in späteren Entwicklungsstadien dendritische *spines*, die den postsynaptischen Rezeptions- und Signaltransduktionsapparat eines Großteils der exzitatorischen Synapsen tragen (Sorra und Harris 2000). Die Induktion, Reifung, aber auch die plastische Reorganisation von dendritischen *spines* ist wesentlich von der Dynamik

des dendritischen Aktincytoskeletts abhängig (Matus 2000), denn Bereiche hoher Aktindynamik ermöglichen Morphologieveränderungen, das heißt Veränderungen der Eigenschaften und Ausdehnungen subzellulärer Kompartimente. Dies stellt eine wesentliche Voraussetzung für neuronale Plastizität dar und ist damit von ausschlaggebender Funktion für komplexe Vorgänge wie Lernen und Gedächtnis (Yuste und Bonhoeffer 2001).

Die im Rahmen dieser Arbeit zu beobachtende Lokalisation von Cobl zu dendritischen *spines* lässt eine funktionelle Rolle des Aktinnukleators auch in der Ausbildung und strukturellen Plastizität der dendritischen *spines*, das heißt Prozessen der späten neuronalen Morphogenese, vermuten. Veränderungen des Cobl-Expressionslevels im Rahmen von RNAi-vermittelten Cobl-*knockdown* sowie Überexpressionsstudien belegten in der Tat, dass Cobl-vermittelte Aktinnukleation funktionelle Bedeutung in der Ausbildung dendritischer Dornfortsätze hat.

Die dabei zu beobachtenden relativ moderaten phänotypischen Veränderungen müssen insbesondere im Zusammenhang mit dem experimentellen Aufbau betrachtet werden. Da die Kultivierung der primären hippocampalen Neuronen in der Regel nicht länger als 12 Tage toleriert wurde, blieben den Neuronen nach Transfektion am 10. Tag in Kultur nur etwa 48 h, um die Fusionsproteine zu exprimieren, die schließlich Einfluss auf die neuronale Morphologie nahmen. Auch in Bezug auf die *knockdown*-Experimente muss angemerkt werden, dass das RNAi-Konstrukt wohl eine deutliche Reduktion der Cobl-Expression bewirken kann (Ahuja et al. 2007), zum Zeitpunkt der Transfektion bereits synthetisiertes endogenes Cobl allerdings Halbwertszeit-abhängig persistierte und auch seine zelluläre Funktion ausübte. Vor diesem Hintergrund betrachtet stellen die Ergebnisse der morphologischen *spine*-Analysen umso deutlicher die funktionelle Relevanz von Cobl-vermittelter Aktinnukleation dar.

Infolge des *knockdown* von endogenem Cobl wurde nach Zusammenfassung aller morphologischer Klassen eine signifikante Verminderung der *spine*-Länge festgestellt. Diese beruhte zum einen auf der im Vergleich zur Kontrolle tendenziell verminderten Länge von pilzförmigen (*mushroom*) und langen-dünnen (*thin*) *spines* sowie auf einem geringfügig erhöhten relativen Anteil an stummeligen (*stubby*) *spines*, was einen Hinweis auf die funktionelle Bedeutung von endogenem Cobl für das Längenwachstum von *spines* lieferte. Dass Cobl weiterhin in das initiale Auswachsen von Dornfortsätzen involviert ist, lässt sich aufgrund der deutlich verminderten Gesamtdichte an *spines* nach Cobl-*knockdown* vermuten. Die zum Teil signifikanten Dichteerniedrigungen bei den hoch frequent vorkommenden

langen-dünnen und pilzförmigen *spines* wurden dabei nicht durch die geringfügig häufiger auftretenden stummeligen und verzweigten *spines* kompensiert.

Es wäre damit denkbar, dass der Aktinnukleator Cobl am Dendritenschaft, dessen stabile Struktur vor allem durch Mikrotubuli und assoziierte Proteine aufrecht erhalten wird (Conde und Cáceres 2009), in der Zellmembran unterliegenden corticalen Aktincytoskelett lokal aktiviert wird und die Bildung unverzweigter, linearer Aktinfilamente vermittelt. Dieser Prozess könnte die notwendige Kraft zum lotrechten Durchbrechen der bestehenden Zellmorphologie erzeugen und so die initiale Genese der *spines* bewirken. Im weiteren Verlauf der Ausbildung und Reifung dendritischer *spines* wäre es vorstellbar, dass Cobl-vermittelte Aktinpolymerisation die entstehenden Zellfortsätze stabilisiert, voran treibt und deren Länge bestimmt. Eine reduzierte Cobl-Expression könnte hierbei zu Instabilität oder dem Überwiegen anderer das Aktincytoskelett beeinflussender Proteine führen und damit Effekte, wie zum Beispiel das zu beobachtende häufigere Auftreten verzweigter *spines*, zur Folge haben.

Cobl scheint damit zellbiologische Funktionen ähnlich den Forminen zu vermitteln, denn auch für das Formin mDia2 wurde eine Rolle in der Elongation langer-dünner *spines* beschrieben (Hotulainen et al. 2009). Formine, die wie Cobl die Polymerisation unverzweigter, linearer Aktinfilamente unterstützen, sind in die Ausbildung von Filopodien involviert (Pellegrin und Mellor 2005). Für Spire, einen auf vier WH2-Domänen basierenden Nukleator ebenfalls unverzweigter, linearer Aktinfilamente, gibt es hingegen aktuell weder Untersuchungen zur Ausbildung von Filopodien noch zu einer möglichen Funktion in dendritischen *spines*.

Eine zentrale Rolle in der Ausbildung des *spine*-Kopfes wird hingegen für den Arp2/3-Komplex beschrieben. Dieser Aktinnukleator scheint ausgehend von einer donutförmigen Region im *spine*-Kopf (Rácz und Weinberg 2006) diesen durch Bildung von 70°-Verzweigungen an bestehenden Aktinfilamenten auszuweiten und zu stabilisieren (Haeckel et al. 2008, Wegner et al. 2008, Hotulainen et al. 2009). Weitere Funktionen in der Längenausbildung dendritischer *spines* werden für den Arp2/3-Komplex nicht beobachtet (Hotulainen et al. 2009). Aktinnukleatoren können damit abhängig von ihrer Lokalisation sowie der Form der durch sie induzierten Aktinfilamente die Ausbildung dendritischer *spines* beeinflussen. Während Nukleatoren zur Induktion unverzweigter Filamente, wie beispielsweise das Formin mDia2, Aktinfilamente zur Stabilisierung sowie dynamischen Verlängerung der *spines* (vergleiche Abb. 6 B, 1 und 2) induzieren, bilden Arp2/3-Komplex-induzierte verzweigte Aktinfilamente die Grundlage für die Ausbildung des *spine*-Kopfes

(Abb. 6 B, 2 und 3). Die aktuellen Ergebnisse der *spine*-Analysen nach *Cobl-knockdown*, die eine Cobl-Funktion im initialen Auswachsen sowie der Elongation dendritischer *spines* beschreiben, liefern eine weitere wesentliche Evidenz zur Unterstützung der von Hotulainen et al. (2009) vorgeschlagenen Mechanismen der Aktindynamik während der Ausbildung dendritischer *spines*.

Damit vereinbar sind ebenfalls die *spine*-Phänotypen nach Überexpression verschiedener Cobl-Fragmente. Da das rekombinante, mit EGFP fusionierte Protein Cobl 1-1337 (erwartete molare Masse ca. 207 kDa) in länger als 7 Tage kultivierten primären hippocampalen Neuronen nach Transfektion keine Überexpression zeigte, die *spine*-Ausbildung jedoch erst nach etwa 7 bis 9 Tagen in Kultur zu erwarten ist, war es im Rahmen dieser Untersuchungen nicht möglich, die Analyse von *Cobl-knockdown*-induzierten *spine*-Effekten durch Überexpression des kompletten Cobl-Proteins zu vervollständigen. Aus diesem Grund wurden verschiedene Cobl-Fragmente eingesetzt, die nach dem aktuellem Stand der biochemischen Charakterisierung des Proteins für Cobl-Funktionen relevant sein könnten. Überexprimiert wurde der WH2-Domänen tragende C-Terminus (Cobl 1176-1337), welcher konstitutiv aktiv die Aktinnukleation vermittelt. Die Kombination aus Cobl N- und C-Terminus (Cobl 1-408, 1176-1337 Δ 262-286) beinhaltet alle bisher bekannten funktionellen Bereiche des Proteins und könnte damit funktionell dem Gesamtlängenprotein entsprechen. Eine dominant-negative Wirkung dagegen ist von dem Cobl N-Terminus (Cobl 1-408) allein zu erwarten, denn dieses Fragment beinhaltet ausschließlich die Interaktionsmotive für die Bindung an Abp1 und Syndapin I, jedoch nicht den Aktin-nukleierenden C-Terminus.

Eine signifikante Verlängerung von langen-dünnen *spines* zeigte sich nach Überexpression von Cobl CT, welches die Aktin-nukleierenden WH2-Domänen trägt, sowie Cobl NT + CT, das zusätzlich die Interaktionsmotive für die Bindung an Aktin-bindendes Protein 1 (Abp1) und Syndapin I beinhaltet. Cobl NT allein vermochte dabei keine signifikante Längenänderung herbeizuführen. Die durch Cobl NT + CT vermittelte Verlängerung der dendritischen Dornfortsätze wurde begleitet von einer Verschiebung der relativen Anteile der *spine*-Klassen. Bei signifikant verminderter Dichte und auch prozentual weniger pilzförmigen *spines* konnte ein erhöhter Anteil an langen-dünnen *spines* festgestellt werden. Ein vergleichbarer Phänotyp wurde mit geringerem Ausprägungsgrad nach Überexpression von Cobl CT beobachtet, jedoch nicht bei Cobl NT. Damit verdeutlichten diese Untersuchungen die funktionelle Bedeutung des Aktinnukleators Cobl für das Längenwachstum dendritischer

spines, denn die Erhöhung des Expressionslevels Aktin-nukleierender Cobl-Fragmente hatte eine signifikante Verlängerung der langen-dünnen *spines* sowie eine scheinbar verminderte Induktion der *spine*-Kopf-Initiierung zur Folge, was Cobl-Funktionen im Bereich der Aktinfilamente zur dynamischen Verlängerung der *spines* (vergleiche Abb. 6 B, 2) nahe legt. Eine durch Cobl CT konstitutiv aktive Aktinnukleation scheint die dendritischen *spines* dabei in der Länge zu stabilisieren bzw. so intensiv G-Aktin zu rekrutieren, dass eine Verzweigung der *spines* – vermittelt durch weitere Nukleatoren oder Regulatoren der Aktindynamik – deutlich, wenn auch nicht signifikant, vermindert auftritt.

Entsprechend der Ergebnisse der *knockdown*-Experimente würde man einen Einfluss der Überexpression von Cobl auf die *spine*-Dichte erwarten, wobei durch Cobl CT und Cobl NT + CT allerdings keine Erhöhung der *spine*-Dichte beobachtet wurde. Möglicherweise ist das Gesamtlängenprotein Voraussetzung für diesen Effekt und weder der Cobl C-Terminus allein noch der zusätzliche N-Terminus sind dafür ausreichend. Die tendenzielle Verminderung der Dichte aller *spines* nach Cobl NT-Überexpression bestätigte allerdings das Modell, dass das initiale Auswachsen dendritischer *spines* abhängig von Cobl-vermittelter Aktinnukleation verläuft. Der Cobl N-Terminus, dem die drei WH2-Domänen fehlen, wirkt dominant-negativ, bindet möglicherweise Cobl-Interaktionspartner, kann allerdings keine neuen Aktinfilamente nukleieren und inhibiert so eventuell das Auswachsen der *spines*.

Die Analyse der Phänotypen nach Überexpression mehrerer Cobl-Fragmente bestätigte die vermuteten Cobl-Funktionen im Rahmen des initialen Auswachsens sowie der Elongation von dendritischen *spines*. Das von Hotulainen et al. (2009) vorgeschlagene Modell zur Aktindynamik in dendritischen *spines* (Abb. 39) kann damit durch die im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten unterstützt sowie um die funktionelle Bedeutung der Cobl-vermittelter Aktinnukleation erweitert werden.

Nach diesem Modell soll das Formin mDia2 an der Spitze sich entwickelnder *spines* lokalisiert sein und durch Bildung unverzweigter Aktinfilamente die *spine*-Elongation hervorrufen. Hotulainen et al. (2009) schlugen vor, dass ab einem bestimmten Punkt der *spine*-Entwicklung auf vorrangig Arp2/3-Komplex-vermittelte Aktinnukleation umgeschaltet wird, sodass dadurch wachsende verzweigte Aktinfilamente schließlich die Kraft zur Aufweitung des *spine*-Kopfes aufbringen. In ausgereiften dendritischen *spines* sollen durch gerichtete ADF/Cofilin-vermittelte Deassemblierung von Aktinfilamenten *spine*-Länge und -Morphologie aufrecht erhalten werden. Für das Auswachsen der *spines* kann allerdings nicht nur das Formin mDia2 verantwortlich sein, denn während aktives mDia2 ausschließlich an der Spitze dendritischer *spines* lokalisiert wurde, war Aktinpolymerisation sowohl an der

Spitze als auch an der Basis von *spines* nachweisbar. Hotulainen et al. (2009) vermuteten daher ein weiteres noch nicht identifiziertes Protein, das die Aktinpolymerisation an der *spine*-Basis vermittelt und im Modell in Abb. 39 rot gekennzeichnet ist.

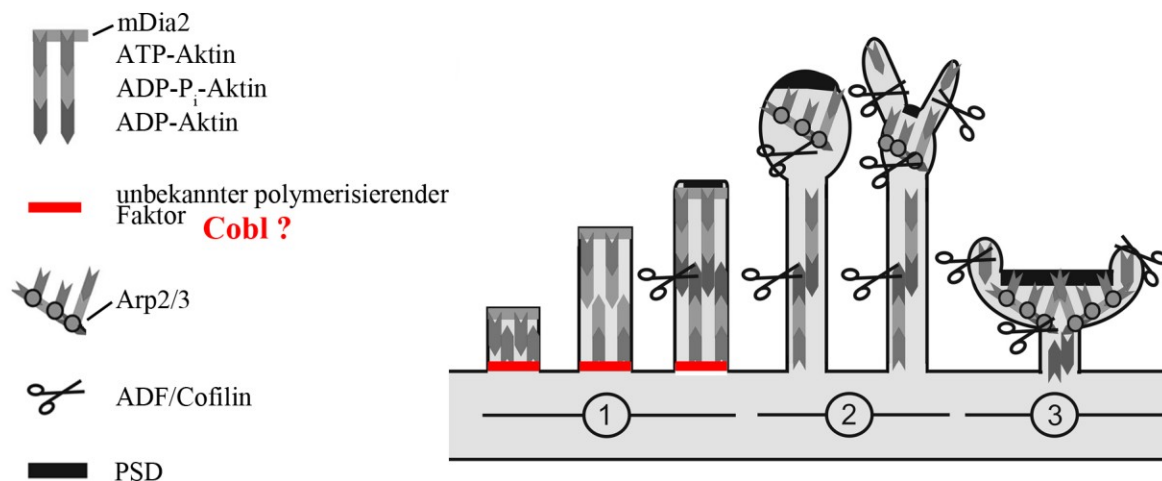


Abb. 39: Modell zur Aktindynamik während der Ausbildung dendritischer *spines* (modifiziert nach Hotulainen et al. 2009).

Im Gegensatz zu Filopodien werden in dendritischen *spines* Aktinfilamente in zwei entgegengesetzten Orientierungen beobachtet. Hotulainen et al. (2009) vermuteten deshalb, dass die *spine*-Initiation am Dendritenschaft sowie die anschließende dynamische Elongation, nicht nur durch das Formin mDia2 an der *spine*-Spitze, sondern weiterhin durch einen bisher unbekannten polymerisierenden Faktor an der *spine*-Basis vermittelt werden (1). Der Arp2/3-Komplex nukleiert verzweigte Aktinfilamente, die zur Ausweitung des die PSD (postsynaptische Dichte) beinhaltenen *spine*-Kopfes führen (2, 3). Die Aufrechterhaltung bestehender morphologischer Strukturen sowie deren dynamische Veränderungen werden weiterhin durch die Deassemblierung bestehender Aktinfilamente mittels ADF/Cofilin gewährleistet. Die aktuellen Ergebnisse zur Rolle von Cobl-vermittelter Aktinnukleation in dendritischen *spines* lassen vermuten, dass Cobl diejenigen Funktionen erfüllt, die von Hotulainen et al. (2009) einem unbekannten polymerisierendem Faktor zugeschrieben wurden.

Aufgrund der aktuellen Datenlage ist es durchaus denkbar, dass der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte Aktinnukleator Cobl genau diese Funktion einnimmt. Bisherige immunfluoreszenzmikroskopische Analysen mittels anti-Cobl-Antikörpern und Phalloidin zur F-Aktin-Darstellung zeigten, dass Cobl nicht nur in *spine*-Köpfen, sondern auch im Bereich des dendritischen Schaftes lokalisiert ist. Um exakte Aussagen bezüglich der Cobl-Lokalisation in *spines* treffen zu können, sind jedoch höher auflösende Untersuchungsverfahren notwendig.

Insgesamt ergaben der RNAi-vermittelte Cobl-*knockdown* sowie die gezielte Überexpression von Cobl-Fragmenten damit wesentliche Einblicke in die funktionelle Bedeutung von Cobl in der späten neuronalen Morphogenese, insbesondere während des initialen Auswachsens sowie der Elongation sich entwickelnder dendritischer *spines*. Der Aktinnukleator Cobl scheint während der Ausbildung dendritischer *spines* maßgeblich in die Dynamik des

Aktincytoskeletts involviert zu sein und mittels dynamischer Veränderung der *spine*-Morphologie sowie -Dichte die strukturelle Grundlage für eine Modulation der synaptischen Aktivität, wie sie zum Beispiel im Rahmen von Lernprozessen beobachtet wird (Yuste und Bonhoeffer 2001), zu schaffen. So wurde ein weiterer Schritt zur mechanistischen Aufklärung synaptischer Plastizität und deren molekularer Grundlagen geleistet, der zukünftig zu einem besseren Verständnis komplexer neuronaler Netzwerke sowie pathologischer Vorgänge beitragen kann. Als ein Beispiel können an dieser Stelle die Untersuchungen von Robinson und Kolb (1999) genannt werden, die nach wiederholter Behandlung von Ratten mit Cocain oder Amphetaminen Veränderungen der Dendriten und dendritischen *spines* im Nucleus accumbens sowie dem präfrontalen Cortex beobachteten. Im Vergleich zu Kontrolltieren zeigte sich ein intensiverer dendritischer Verzweigungsgrad bei erhöhter *spine*-Dichte und Verdopplung der Inzidenz verzweigter *spines*. Man kann deshalb davon ausgehen, dass eine wiederholte Applikation von Cocain und/oder Amphetaminen nicht nur biochemische, sondern auch morphologische Veränderungen der Neuronen sowie Reorganisation synaptischer Verbindungen im Nucleus accumbens und präfrontalem Cortex auslöst, die schließlich Toleranz, Abhängigkeit und psychotische Symptome erklären könnten (Robinson und Kolb 1999). Diese Beobachtungen sind ganz ähnlich dem nach Cobl-Überexpression zu beobachtenden neuronalen Phänotypen. Es wäre also durchaus denkbar, dass die untersuchten Substanzen Signaltransduktionswege zum Aktinnukleator Cobl aktivieren und es schließlich zu Cobl-vermittelten Veränderungen der neuronalen Morphologie kommt. Daran wird beispielhaft deutlich, dass die aktuelle Untersuchung zur Rolle von Cobl-vermittelter Aktinnukleation in der Ausbildung dendritischer *spines* ein essentieller Baustein für pathophysiologische Erkenntnisse ist. Weitere Experimente zur Cobl-beinhaltenen Aktinnukleationsmaschinerie sowie Regulatoren der Cobl-Funktion müssen folgen.

Aufgrund der Abhängigkeit der nach veränderter Cobl-Expression zu beobachteten Phänotypen nicht nur von der Anwesenheit des Aktin-nukleierenden, sondern darüber hinaus auch des Abp1- und Syndapin I-bindenden Bereichs ergibt sich die spannende Frage, ob Cobl-Funktionen in der Ausbildung dendritischer *spines* möglicherweise durch dessen Interaktionspartner Abp1 und Syndapin I vermittelt werden. In Lokalisationstudien wurde zunächst gezeigt, dass Cobl sowie die auf molekularer Ebene mit ihm interagierenden cytoskelettalen Proteine Abp1 und Syndapin I sowohl in corticalen und hippocampalen Pyramidenzellen als auch in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns kolokalisieren. Deren

Zusammenspiel im Rahmen von koordinierter Morphogenese und struktureller Plastizität scheint daher in diesen Neuronen nahe liegend.

Abp1 wird unter anderem neuronal exprimiert (Larbolette et al. 1999, Kessels et al. 2000) und ist in diesen Zellen an der regelhaften Ausbildung des Axons beteiligt (Pinyol et al. 2007). Bisherige Untersuchungen in *spines* (Haeckel et al. 2008) haben gezeigt, dass die Abp1-Überexpression zu einer Erhöhung der Dichte an pilzförmigen *spines* führt. Der Abp1-*knockdown* hingegen hat bei unveränderter gesamter *spine*-Dichte eine relative Verminderung der pilzförmigen sowie Erhöhung der Dichte der langen-dünnen *spines* zur Folge. Abp1 scheint über die Kontrolle des Arp2/3-Komplexes, welcher in einer donutförmigen Region im *spine*-Kopf lokalisiert ist (Rácz und Weinberg 2008), und in Kooperation mit den postsynaptischen Gerüstproteinen der ProSAP/Shank-Familie Einfluss auf die Ausbildung des *spine*-Kopfes und damit die Reifung der dendritischen *spines* zu nehmen (Haeckel et al. 2008).

Aktuell gibt es noch keine Daten zur Rolle von im Gehirn hoch exprimiertem Syndapin I in der Morphogenese von dendritischen *spines*. Die Struktur des Proteins sowie bisherige Untersuchungen zur frühen neuronalen Morphogenese, die Syndapin I-Funktionen in der Entwicklung des axonalen Fortsatzes nachweisen konnten (Dharmalingam et al. 2009), lassen eine funktionelle Bedeutung von Syndapin I in der Membrankurvaturierung im Rahmen der Initiation des Wachstums an der *spine*-Basis vermuten. Die experimentelle Untersuchung dessen steht allerdings noch aus.

So wäre es zum Beispiel denkbar, dass Cobl als Effektor bisher noch unbekannter Signaltransduktionswege zunächst durch Abp1 und/oder Syndapin I zur Zellmembran rekrutiert wird, um dort lokal eine intensive Nukleation unverzweigter, linearer Aktinfilamente zur Ausbildung dendritischer *spines* zu generieren. Auch im Bereich des *spine*-Kopfes ist die Kooperation von Cobl und Abp1 wahrscheinlich. Dort könnte Abp1 die Aktinnukleatoren Cobl und Arp2/3-Komplex, und damit die Bildung linearer und verzweigter Aktinstrukturen, funktionell verbinden.

Funktionelle Interaktionen von Cobl und Abp1 bzw. Syndapin I sind auch im Zusammenhang mit Membrantopologieveränderungen während der exocytotischen Freisetzung von Neurotransmittern sowie anschließender kompensatorischer Endocytose denkbar. Möglicherweise spielt eine defiziente Cobl-Funktionalität eine Rolle in der Ausbildung des murinen Syndapin I-*knockout*-Phänotyps, im Rahmen dessen vergrößerte präsynaptische Vesikel, Störungen der synaptischen Transmission sowie epileptische Anfälle der Versuchstiere beobachtet wurden (Koch 2009 [Dissertation]).

Sehr eindrucksvoll wurde der Aktinnukleator Cobl weiterhin in den großen Purkinje-Zellen des Kleinhirns detektiert, die über ihren in einer Ebene in die Molekularschicht ragenden, weit verzweigten Dendritenbaum Informationen aus der Olive (Kletterfasern) sowie nach Verschaltung in den Körnerzellen aus Rückenmark, Pons sowie den Vestibulariskernen (Moosfasern) erhalten. Nach Integration dieser elektrischen Signale ausgebildete Aktionspotentiale senden die Purkinje-Zellen zu den Kleinhirnkernen und sind damit maßgeblich in die Koordination und Feinabstimmung von Bewegungen sowie motorische Lernprozesse involviert. Ebenso wie in den corticalen Pyramidenzellen ist die Morphologie der Purkinje-Zellen, insbesondere die Ausbildung und Verzweigung von Axon und Dendriten, sowie deren strukturelle Plastizität von enormer funktioneller Bedeutung. Unreife Purkinje-Zellen bilden in Maus und Ratte in der ersten Woche postnatal mehrere Primärdendriten aus, die mit Ausnahme eines Dendriten in der zweiten Woche zurückgebildet werden. Der Dendrit bildet schließlich einen weit verzweigten dendritischen Baum aus, der sich bis zur Oberfläche des Kleinhirns erstreckt (Tanaka 2009). Diese dramatischen Veränderungen der Zellmorphologie werden wesentlich durch die Dynamik des Aktincytoskeletts reguliert (Luo 2002) und erfolgen zunächst unabhängig von synaptischer Transmission vermittelt durch intrinsische Mechanismen. Synaptische Kontakte werden im Anschluss daran in Abhängigkeit von der elektrischer Aktivität präzisiert (Cesa et al. 2007, Sotelo und Dusart 2009). Aktuell gibt es kaum Untersuchungen zur Bedeutung von Regulatoren der Aktindynamik speziell in Purkinje-Zellen. Für die Aktinnukleatoren Spire-1 und Formin-2 wurde eine Expression unter anderem in cerebellären Purkinje-Zellen gezeigt (Schumacher et al. 2004), woran sich bisher jedoch (noch) keine funktionellen Untersuchungen anschlossen.

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete hohe Cobl-Expression in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns legt in jedem Fall eine funktionelle Rolle des Aktinnukleators in der Neuromorphogenese nahe. Untersuchungen an cerebellären Schnittkulturen im Rahmen dieser Arbeit zeigten in der Tat, dass die Ausbildung und Aufrechterhaltung der typischen Morphologie einer Purkinje-Zelle abhängig von endogen exprimiertem Cobl erfolgt. In diesen Zellen resultierte der RNAi-vermittelte Cobl-*knockdown* in einer deutlich reduzierten dendritischen Arborisierung mit Verminderung der Gesamtfläche des Dendritenbaumes sowie signifikant erniedrigter absoluter und relativer Verzweigungszahl.

Die Herstellung organotypischer cerebellärer Schnittkulturen sowie die anschließende Transfektion mittels Helios® *Gene Gun*-System ermöglichen dabei die gezielte morphologische Analyse einzelner transfizierter Purkinje-Zellen, die noch eingebettet in der Zellarchitektur vorliegen, die sie *in vivo* umgibt. Die Ergebnisse dieser morphologischen

Untersuchungen liefern daher einen starken Hinweis auf die Funktion von endogenem Cobl in cerebellären Purkinje-Zellen.

Der weit verzweigte Dendritenbaum, an dem der Großteil aller synaptischen Eingänge zu den Purkinje-Zellen lokalisiert ist, ermöglicht die Integration zahlreicher Signale und beeinflusst mit seiner Morphologie die elektrophysiologische Verarbeitung grundlegend. Dass Cobl für die Morphogenese dieses dendritischen Kompartimentes von maßgeblicher Bedeutung ist, verdeutlicht eindrucksvoll die physiologische Relevanz dieses Aktinnukleators und kann damit zukünftig möglicherweise helfen, auch pathologische Mechanismen in der Entwicklung des Kleinhirns besser verstehen zu können. Voraussetzung dafür werden weitere Untersuchung zur Cobl-regulierenden Signaltransduktionsmaschinerie sowie funktionellen Cobl-Interaktionspartnern in Purkinje-Zellen sein. Einen ersten Ansatz dafür lieferten immunhistochemische Analysen von Abp1 und Syndapin I, die deren Kolo-kalisation mit Cobl im Bereich des Purkinje-Zell-Dendritenbaumes zeigten. Ähnlich des im Rahmen der *spine*-Entwicklung vorgeschlagenen Mechanismus wäre es denkbar, dass diese membranbindenden Proteine Cobl zur Zellmembran rekrutieren und dort dessen lokale Anreicherung initiieren. Die anschließende Cobl-vermittelte Aktinnukleation könnte die Kraft zur Ausbildung dendritischer Verzweigungen aufbringen. Eine Induktion bzw. Stabilisierung der Membrankrümmungen an der Basis neuer Verzweigungen wäre dabei durch die F-BAR-Domäne von Syndapin I möglich. Um diese Hypothese zu untersuchen, müssen morphologische Analysen in Purkinje-Zellen nach Veränderung der Expressionslevel von Syndapin I bzw. Abp1 und gegebenenfalls eine gleichzeitige Veränderung der Cobl-Expression folgen.

Der Aktinnukleator Cobl wurde in beeindruckendem Maße in corticalen und hippocampalen Pyramidenzellen sowie in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns detektiert. Diese Zelltypen spielen aufgrund ihrer Größe und synaptischen Kontakte eine wesentliche Rolle für die Integration elektrischer Signale im neuronalen Netz und die regelrechte Ausbildung ihrer Morphologie ist unerlässlich. Durch dynamische Reorganisationsprozesse und synaptische Plastizität ermöglichen sie die komplexe neuronale Informationsverarbeitung in Abhängigkeit von der Art und Dauer ihrer Aktivierung, unter anderem im Rahmen von Lernprozessen und Koordination der Motorik. Aufgrund der intensiven Cobl-Expression in den genannten Zelltypen scheint eine funktionelle Bedeutung dieses Aktinnukleators für deren Ausbildung der Morphologie sowie Plastizität nahe liegend und erweitert bisherige Erkenntnisse zur Rolle von Cobl in der neuronalen Morphogenese maßgeblich.

8.2 Cobl-Funktionen in nicht-neuronalen Geweben

Eine über die Ausbildung neuronaler Morphologie hinaus gehende Bedeutung des Aktinnukleators Cobl, die nach Detektion von Cobl in Homogenaten nicht-neuronaler Gewebe (Hoden, Lunge, Milz) vermutet wurde (Ahuja et al. 2007), konnte im Rahmen dieser Arbeit durch immunhistochemische Analysen bestätigt werden. Dabei erfolgte unter Verwendung zweier gegen distinkte Molekülbereiche gerichtete anti-Cobl-Antikörper die Charakterisierung von Kompartimenten, Zelltypen und subzellulären Regionen, die durch Kolokalisationsuntersuchungen von Cobl und seinen Interaktionspartnern Abp1 und/oder Syndapin I ergänzt wurden.

Im Keimepithel der Tubuli seminiferi des **Hodens** entwickeln sich aus den basal gelegenen und relativ großen, runden Spermatogonien über Spermatocyten I und Spermatocyten II die Spermatiden, die in der Spermiogenese schließlich zu funktionellen Spermien ausreifen. Während dieser Entwicklung durchlaufen die Keimzellen eine extreme Veränderung der rundlichen in eine längliche Zellform und bewegen sich aus dem basalen Kompartiment nach adluminal. In Xiao und Yang (2007) wird zusammenfassend dargestellt, dass diese Prozesse abhängig von der Dynamik des corticalen Aktincytoskeletts erfolgen und mit der ständigen Auflösung und Neubildung von Zell-Zell-Kontakten mit den Sertoli-Zellen einhergehen. Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zur Lokalisation des neuen Aktinnukleators Cobl im Hoden sind konsistent mit vorherigen Western Blot-Analysen (Ahuja et al. 2007) und erlauben die Zuordnung von Cobl zu Zellkern und Cytoplasma der Keimzellen. Da der Cobl-Interaktionspartner Abp1 ebenfalls cytosolisch im Keimepithel nachgewiesen wurde, könnten Cobl-Abp1-Komplexe von funktioneller Bedeutung beispielsweise in der Ausbildung des kontraktiven Rings aus Aktin und Myosin II sein. Dieser vermittelt die Durchschnürung der Mutterzelle, wobei Aktinfilamente zur Teilungsfurche rekrutiert, aber auch Formin-abhängig *de novo* polymerisiert werden (Von Dassow 2009).

Weiterhin finden in sich teilenden Zellen vesikuläre Membrantransportprozesse statt, mit dem Ziel, benötigtes Membranmaterial zur sich vergrößernden Zelloberfläche zu bringen. Es ist eine attraktive Arbeitshypothese, dass Cobl als Aktinnukleator in diese zellbiologischen Prozesse involviert sein könnte.

Unabhängig von Abp1 scheint Cobl außerdem zellbiologische Funktionen im Zellkern zu übernehmen. Es war zu beobachten, dass anti-Cobl^{ARA} vor allem nukleär lokalisiertes Cobl detektierte, während anti-Cobl^{DBY} zusätzlich ein cytoplasmatisches Immunfluoreszenzsignal

lieferte. Dies könnte durch eine unterschiedliche Maskierung der jeweiligen Epitope durch Cobl-bindende Proteine bzw. nach Proteinquervernetzung durch Paraformaldehydfixierung hervorgerufen werden.

Das intensive Immunfluoreszenzsignal im adluminalen Kompartiment des Keimepithels nach immunhistochemischer Färbung mit anti-Cobl^{DBY}, das vor allem in Kolokalisation bzw. direkter Nähe zum DAPI-Signal zu beobachten war, lässt sich nicht allein durch eine relative Erhöhung der Kerndichte erklären. Insbesondere am Akrosom, subakrosomal, im Spermienhals sowie an der Basis des Schwanzteils sind Aktinanreicherungen beschrieben, die vor allem die Ausformung von Zellkern und Akrosom koordinieren (Kierszenbaum et al. 2003, Xiao und Yang 2007) und Cobl könnte hier an morphogenetischen Prozessen im Rahmen der Spermiogenese beteiligt sein.

Betrachtet man das homogene Immunfluoreszenzsignal in den Tubuli seminiferi nach anti-Cobl^{DBY}-Färbung, so ist es wahrscheinlich, dass auch die Sertoli-Zellen Cobl-positiv waren. In diesen dynamischen Zellen, die unter anderem über ektoplasmatische Spezialisierungen durch ständige Assemblierung, Deassemblierung und Reassemblierung von Zonulae occludentes (*Tight junctions*) die gerichtete Bewegung der Keimzellen nach apikal im Keimepithel ermöglichen sowie intensive Phagozytose betreiben, ist eine Bedeutung des Aktinnukleators Cobl durchaus denkbar. Um diese Vermutung zu bestätigen, sind jedoch weitere Untersuchungen, zur Differenzierung der Sertoli-Zellen, beispielsweise Kolokalisationsanalysen mit einem spezifischen Sertoli-Zell-Marker, notwendig.

In der **Lunge** konnte die in Ahuja et al. (2007) beschriebene Cobl-Expression immunhistochemisch nicht bestätigt werden, denn Verdünnungen beider anti-Cobl-Antikörper von 1:1000, 1:500, 1:100 und 1:50 lieferten kein positives Signal im Vergleich zu den Kontrollfärbungen (Daten nicht gezeigt). Diese Inkonsistenz wäre zum einen erklärbar durch eine intensive Maskierung der Cobl-Epitope durch bindende Proteine oder Paraformaldehyd-vermittelte Proteinquervernetzung. Eine weitere Möglichkeit stellt eine putative Cobl-Expression in Lymphknoten dar, die neben der Milz ebenfalls zu den sekundären lymphatischen Organen zählen und möglicherweise Cobl exprimieren. Assoziierte Lymphknoten wurden wahrscheinlich gemeinsam mit dem Lungengewebe für die biochemischen Analysen homogenisiert, konnten in den angefertigten Gewebeschnitten jedoch nicht dargestellt werden.

Die **Milz** als sekundär lymphatisches Organ lässt sich anatomisch in die rote und weiße Milzpulpa untergliedern. Sowohl Cobl als auch Abp1 wurden im Rahmen dieser Arbeit in der periarteriellen Lymphocytenscheide (T-Zell-Region) sowie den Milzknötchen (Malpighi-Körperchen, B-Zell-Region), Kompartimenten der weißen Milzpulpa, nachgewiesen. Die Ergebnisse für das Aktin-bindende Protein 1 sind konsistent zu Resultaten anderer Arbeitsgruppen, die Abp1 als Adapterprotein im Rahmen von B-Zell-Rezeptor-vermittelter Antigen-Prozessierung vorschlugen (Onabajo et al. 2008) und in Abp1-*knockout*-Mäusen eine verminderte T-Zell-Proliferation sowie Antigen-spezifische Antikörperproduktion und damit eine reduzierte Immunantwort beobachteten (Han et al. 2005). Die gleichzeitige Expression von Cobl und Abp1 sowohl in B- als auch in T-Lymphocyten lässt eine funktionelle Bedeutung von Cobl-Abp1-Komplexen in diesen Zelltypen vermuten. Möglicherweise sind diese in die In- und Externalisierung von Oberflächenproteinen oder die Prozessierung und Präsentation antigenen Determinanten involviert. Im Rahmen dieser Prozesse sind endo- und exozytotische Vorgänge unerlässlich und eine Intervention an dieser Stelle, zum Beispiel durch Abp1-*knockout*, könnte die von Han et al. (2005) beobachteten phänotypischen Veränderungen durchaus erklären. Eine Cobl-Beteiligung an cytosklettalen Prozessen wie Migration oder Kontrolle der Morphologie von Lymphocyten ist ebenfalls denkbar.

Welche Bedeutung der Aktinnukleator Cobl im Bereich der roten Milzpulpa hat, die sich im Wesentlichen aus retikulären Fibroblasten, retikulären Fasern (Kollagen III) sowie den weitlumigen Milzsinus zusammensetzt, lässt sich ebenfalls nur vermuten. Wahrscheinlich ist, dass Cobl Abp1-unabhängig zur Aufrechterhaltung der Morphologie der fibroblastischen Zellen beiträgt und möglicherweise die Ausbildung deren sternförmiger Fortsätze induziert und/oder stabilisiert. Cobl-Funktionen in der exocytotischen Freisetzung von Kollagen oder der anschließenden kompensatorischen Endocytose sind ebenfalls denkbar und könnten ähnlich den Prozessen ablaufen, die im Folgenden zum Pankreas beschrieben werden. Die auch in diesem Fall zu beobachtenden Unterschiede der Cobl-Detektion in Abhängigkeit vom eingesetzten Antikörper könnten auf eine unterschiedliche Zugänglichkeit von Epitopen zurückzuführen sein.

Die Expression des Aktinnukleators Cobl wurde weiterhin spezifisch in den Langerhans-Inseln der **Bauchspeicheldrüse** (Pankreas), die in die bisherige Western Blot-Analysen zum Cobl-Nachweis in Gewebehomogenaten aus der Ratte (Ahuja et al. 2007) nicht einbezogen war, beobachtet. Während anti-Cobl^{ARA} wahrscheinlich aufgrund einer Maskierung und folgender verminderter Zugänglichkeit der Epitope für die Antikörper nicht in der Lage war,

Cobl zu detektieren, vermittelte anti-Cobl^{DBY} ein positives Immunfluoreszenzsignal in den Insulin-bildenden β -Zellen und weiterhin in einzelnen randständigen Insulin-negativen Zellen der Langerhans-Inseln. Diese könnten sowohl Glukagon-bildende α -Zellen als auch δ -Zellen oder PP-Zellen, welche Somatostatin bzw. pankreatisches Polypeptid sezernieren, repräsentieren, die sich gemeinsam durch eine Insel-spezifische Genexpression vom umliegenden exokrinen Pankreas unterscheiden lassen (Madsen et al. 1996). Eine genaue Differenzierung dieser Zelltypen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht. Cobl wird nicht spezifisch in einem Zelltyp exprimiert, sondern ist vielmehr in allen endokrinen Zellen des Pankreas lokalisiert, weshalb dort eine zellbiologische Funktion des neuen Aktinnukleators zu erwarten ist. Sehr wahrscheinlich erfüllt Cobl diese Aufgabe(n) in Kooperation mit seinen Interaktionspartnern Abp1 und Syndapin I, denn auch für diese wurde im endokrinen Pankreas erstmals spezifisch eine hohe Expression nachgewiesen. Während Abp1 als ubiquitär exprimiertes Protein beschrieben ist (Kessels et al. 2000), war Syndapin I bisher als hoch spezifisch im Gehirn charakterisiert worden (Plomann et al. 1998, Qualmann et al. 1999). Weitere Immunfluoreszenzanalysen bestätigten die Lokalisation von Cobl und Abp1 bzw. Syndapin I in den gleichen endokrinen Zellen und zeigten ähnliche cytosolische Verteilungsmuster der untersuchten Proteine auf. Cobl könnte damit in Abp1- und/oder Syndapin I-vermittelte Prozesse involviert sein und eine weitere funktionelle Verbindung zwischen Membrantransportprozessen und der Dynamik des corticalen Aktincytoskeletts ermöglichen. Die Expression von Cobl, Abp1 und Syndapin I wurde dabei spezifisch nur in den endokrinen Zellen der Langerhans-Inseln beobachtet, wodurch eine differenzielle Genexpression und damit Regulation zellbiologischer Prozesse in neuroendokrinen und exokrinen Zellen des Pankreas deutlich wird.

Die Exocytose verläuft in neuroendokrinen Zellen abhängig vom Aktincytoskelett (Malacombe et al. 2006). Eine Rolle von Cobl-vermittelter Aktinnukleation im Rahmen dieses Prozesses ist wahrscheinlich. Früher ging man davon aus, dass corticales Aktin in neuroendokrinen Zellen eine Barriere für sekretorische Vesikel bildet und dessen lokale Depolymerisation passiv die Vesikelbewegung zur Plasmamembran ermöglicht (Orci et al. 1972, Aunis und Bader 1988). Heute ist auch eine aktive Beteiligung des Aktincytoskeletts an Exocytoseprozessen bekannt (Giner et al. 2005). So ist es wahrscheinlich, dass nicht nur Mikrotubuli, sondern auch Aktinfilamente und assoziierte Myosine am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt sind (Malaisse et al. 1975, Wang und Thurmond 2009). In der späten Phase der Exocytose, nach der Fusion von Vesikel- und Plasmamembran, wird eine Beteiligung des Aktincytoskeletts an der Öffnung der Pore zur Freisetzung des

Vesikelinhaltes vermutet (Malacombe et al. 2006). In diese Prozesse scheint der Syndapin I- und Abp1-Interaktionspartner N-WASP involviert zu sein (Malacombe et al. 2006). Somit könnte sowohl Syndapin I als auch Abp1, deren Kooperation mit Dynamin im Rahmen von Vesikelabschnürungsprozessen beschrieben ist (Qualmann et al. 2000, Kessels et al. 2001, Kessels und Qualmann 2006), die späte Phase der Exocytose sowie die anschließende kompensatorische Endocytose (Orci et al. 1973) beeinflussen. Die Reorganisation des corticalen Aktincytoskeletts könnte dabei zum einen über N-WASP-vermittelte Aktivierung des Arp2/3-Komplexes (Qualmann et al. 1999, Kessels und Qualmann 2002, Pinyol et al. 2007) und zum anderen über Aktinnukleation durch Cobl erfolgen.

Weiterhin scheint Cobl in endokrinen pankreatischen Zellen unabhängig von Abp1 und Syndapin I zellbiologische Funktionen im Kern zu erfüllen.

Der Nachweis einer intensiven, spezifischen Expression von Cobl sowie seiner bisher bekannten Interaktionspartner Abp1 und Syndapin I, der einen starken Hinweis auf zellbiologische Funktionen dieser Proteine in den endokrinen Zellen des Pankreas liefert, stellt eine wesentliche Grundlage für weiterführende funktionelle Studien dar. Bei Diabetes mellitus Typ 2-Erkrankungen wird (unter anderem) eine defiziente Insulinsekretion beobachtet (Guillausseau und Laloi-Michelin 2003), die im Rattenmodell mit einer verminderten Expression von Proteinen, welche in exocytotische Prozesse involviert sind, einhergeht (Zhang et al. 2002). Daher sind weitere zellbiologische Untersuchungen (unter anderem zu Cobl, Abp1 und Syndapin I) in neuroendokrinen Zellen unerlässlich, um ein besseres Verständnis pathophysiologischer Prozesse im Rahmen von Diabetes mellitus zu erlangen und damit schließlich gezielt therapeutisch intervenieren zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Cobl-Expression auf zellulärer und zum Teil subzellulärer Ebene unter Verwendung zweier, gegen distinkte Molekülbereiche gerichtete anti-Cobl-Antikörper erfolgreich charakterisiert. Da der Antikörper anti-Cobl^{ARA} alle bekannten Cobl-Spleißvarianten erkennt, ist es unwahrscheinlich, dass die in immunhistochemischen Untersuchungen detektierten Unterschiede in der Signalintensität oder -lokalisation nach Färbung mit den beiden Antikörpern durch die Expression verschiedener Cobl-Spleißvarianten hervorgerufen wurde. Die Beobachtungen erscheinen vielmehr durch eine unterschiedliche Zugänglichkeit der Epitope verursacht, zum Beispiel durch in diesem Bereich bindende Cobl-Interaktionspartner oder auch infolge der Gewebefixierung. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass anti-Cobl^{ARA}, dessen Epitop in unmittelbarer Nähe zu den bekannten Abp1- und Syndapin I-Interaktionsmotiven liegt, ein

im Vergleich zu anti-Cobl^{DBY} „fehlendes“ Cobl-Signal im cytosolischen Bereich des Keimepithels zeigte (Abb. 30), was etwa der Region der hohen Abp1-Expression im Hoden entspricht (Abb. 36 B). Dieses Phänomen zeigte sich auch in den immunhistochemischen Untersuchungen von Milz und Pankreas.

In Immunfluoreszenzfärbungen kultivierter Neuronen (1 Zelllage), in denen die Antikörper aufgrund der deutlich geringeren physikalischen Barriere im Vergleich zu 55 µm-Gehirnschnitten einen wesentlich besseren Zugang zur ihren Antigenen finden, wurden zwischen den anti-Cobl^{ARA}- und anti-Cobl^{DBY}-vermittelten Signalen keine Intensitätsunterschiede, sondern vielmehr verschiedene Lokalisationen beobachtet. In diesem Fall könnten durch anti-Cobl^{ARA} durchaus kurze Cobl-Spleißvarianten dargestellt werden, die an der Plasmamembran so intensiv angereichert vorliegen, dass sie trotz eventueller Bindung an Interaktionspartner detektiert werden. Eine exakte Lokalisierung verschiedener Cobl-Spleißvarianten erfordert jedoch Verfahren wie RT (Reverse Transkriptase)-PCR oder *In situ*-Hybridisierung zum spezifischen Nachweis von mRNA.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist das Phänomen der limitierten Proteolyse. Es ist beispielsweise denkbar, dass Cobl zunächst als gesamtes Protein synthetisiert und seine Nukleationsaktivität schließlich durch regulatorische Proteine beeinflusst wird. Diese könnten eine limitierte Proteolyse im N-terminalen Bereich auslösen, wodurch das Epitop des Antikörpers anti-Cobl^{ARA} möglicherweise zerstört oder maskiert wird und damit in Immunfluoreszenzanalysen kein Signal vermitteln kann.

3 Mögliche Cobl-Funktionen im Zellkern

Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse aller im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen zur Cobl-Expression wird deutlich, dass der Aktinnukleator Cobl zumindest zeitweise im Zellkern lokalisiert ist.

Nachdem Lane (1969) erstmals die Existenz von Aktin im Zellkern vermutet hatte, war die nukleäre Lokalisation dieses cytoskelettalen Proteins lange Zeit umstritten. Heute ist weitgehend akzeptiert, dass monomeres Aktin passiv durch Diffusion oder aktiv über Aktin-bindende Proteine in den Zellkern gelangen kann und dort sehr wahrscheinlich verschiedene Funktionen wie zum Beispiel mechanische Stabilisierung, Transportprozesse, aber auch Transkriptionsregulation in Abhängigkeit von Aktin-bindenden und regulatorischen Proteinen erfüllt (Vartiainen 2008).

Der Aktinnukleator Cobl wurde in primären corticalen und hippocampalen Neuronen nach 2, 5, 12 und 21 Tagen in Kultur durch zwei unterschiedliche anti-Cobl-Antikörper nukleär detektiert (Daten nicht vollständig gezeigt). Die Aminosäuresequenz des Proteins beinhaltet zwei putative Kernlokalisierungssignale (Cobl 232-249, Cobl 670-688). Dies macht den Kernimport und zumindest zeitweise eine Cobl-Lokalisation im Zellkern wahrscheinlich. Schnitte aus Cortex und Hippocampus zeigten die Cobl-Lokalisation im Zellkern, während nach immunhistochemischer Färbung in Purkinje-Zellen der Zellkern eher ausgespart blieb. Eine Kernlokalisierung zeigte sich auch in nicht-neuronalen Geweben wie der Milz, dem endokrinen Pankreas und den Tubuli seminiferi des Hodens (Keimepithel). Eventuelle zellbiologische Funktionen nimmt Cobl im nukleären Kompartiment jedoch unabhängig von den bisher bekannten Interaktionspartnern Abp1 und Syndapin I wahr, denn in immunhistochemischen Untersuchungen sparten die durch sie vermittelten Signale den Zellkern aus. Nichtsdestotrotz könnten diese Proteine über ihre cytosolische Interaktion mit Cobl dessen Bewegung in den Kern regulieren.

Welche zellbiologischen Funktionen Cobl im Zellkern übernimmt, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Funktionelle Untersuchungen zur Cobl-Dynamik im Zellkern müssen folgen, denn nur so kann aufgeklärt werden, ob Cobl in Aktin-vermittelte Prozesse (Zheng et al. 2009) im Rahmen von Regulation der Genexpression, Chromatin-Remodellierung oder Assemblierung der Kernmembran und mechanischer Stabilität im Zellkern involviert ist oder dort gegebenenfalls eine ganz andere Funktionalität erfüllt.

Vor allem aber sollten weitere Cobl-Interaktionspartner identifiziert werden, um die Signaltransduktionsmaschinerie um den Aktinnukleator sowie dessen weitere Effektorfunktionen, die möglicherweise auch unabhängig von Aktin erfolgen, besser verstehen zu können.

9 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Der Aktinnukleator Cobl, der basierend auf drei C-terminalen WH2-Domänen die Polymerisation linearer, unverzweigter Aktinfilamente initiiert, ist im Gehirn hoch exprimiert und erfüllt kritische Funktionen sowohl in der frühen als auch in der späten neuronalen Morphogenese. Cobl ist dabei insbesondere in die Entwicklung des dendritischen Kompartimentes involviert. In hippocampalen Pyramidenzellen sowie den Purkinje-Zellen des Kleinhirns ist Cobl von maßgeblicher Bedeutung für die Ausbildung des komplex verzweigten Dendritenbaumes. Die aktuelle Studie zeigt, dass Cobl weiterhin kritische Funktionen während des initialen Auswachsens sowie der Elongation von Aktin-reichen hippocampalen dendritischen *spines* (Dornfortsätzen) erfüllt. Cobl-vermittelte Aktinnukleation kann damit insgesamt als wesentliche Voraussetzung für eine kontrollierte Entwicklung der neuronalen Morphologie charakterisiert werden, die eine Grundlage für die Ausbildung und Dynamik komplexer neuronaler Netze schafft.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen lieferten darüber hinaus erste Hinweise auf eine Rolle des Aktinnukleators Cobl auch in nicht-neuronalen Geweben. Mittels spezifischer affinitätsgereinigter Antikörper wurde Cobl im Keimepithel des Hodens sowie der roten und weißen Milzpulpa detektiert. Weiterhin zeigten die Langerhans-Inseln des endokrinen Pankreas ein positives Cobl-Signal. Die Analysen liefern damit einen starken Hinweis auf physiologische Cobl-Funktionen in diesen Geweben, möglicherweise im Rahmen von Membrantransportprozessen oder der Modulation der Membrantopologie in Kooperation mit den Cobl-Interaktionspartnern Abp1 und/oder Syndapin I. Die Untersuchung weiterer Gewebe sowie verschiedener Stadien der Entwicklung könnte zusätzliche Evidenz für Cobl-Funktionen in nicht-neuronalen Geweben erbringen und durch die Lokalisierung möglicher Cobl-Spleißvarianten mittels RT (Reverse Transkriptase) - PCR oder *In situ*-Hybridisierung ergänzt werden. Cobl-exprimierende Gewebe bzw. Zellen können schließlich in experimentellen Studien gezielt manipuliert werden, um die mechanistischen Grundlagen von Cobl-Funktionen auch in Verbindung mit den Interaktionspartnern des Aktinnukleators *in vitro* und *in vivo* näher zu beleuchten.

Die aktuelle Studie zeigt zusammen mit den in Ahuja et al. (2007) publizierten Daten die kritische Rolle des Aktinnukleators Cobl in verschiedenen Stadien der Neuromorphogenese und liefert starke Hinweise auf Cobl-Funktionen auch in nicht-neuronalen Zellen.

Kolokalisationsstudien mit den Cobl-Interaktionspartnern Abp1 und Syndapin I führten darüber hinaus zu der Arbeitshypothese, dass durch diese Bindungspartner die Lokalisation

und/oder Funktion des äußerst potenten Aktinnukleators Cobl entscheidend beeinflusst werden könnte. Die Aufklärung von Signaltransduktionskaskaden und Regulationsmechanismen, die auf Cobl einwirken, erfordert auch die Identifizierung weiterer potentieller Cobl-Bindungspartner sowie die molekulare und zellbiologische Beschreibung der Interaktionen. Eine Voraussetzung dafür bilden unter anderem die biochemische Analyse des bis heute weitgehend uncharakterisierten Cobl N-Terminus sowie funktionelle Untersuchungen zu Cobl-Funktionen im Kern, die aufgrund der aktuellen immunhistochemischen Ergebnisse nahe liegend sind.

Durch das Modell einer Cobl-*knockout*-Maus könnte schließlich die physiologische und pathophysiologische Bedeutung der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen neuronalen bzw. nicht-neuronalen Cobl-Funktionen *in vivo* erbracht werden.

10 LITERATURVERZEICHNIS

Ahuja R, Pinyol R, Reichenbach N, Custer L, Klingensmith J, Kessels MM, Qualmann B. 2007. Cordon-Bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell*, 131(2):337-350.

Andersson F, Jakobsson J, Löw P, Shupliakov O, Brodin L. 2008. Perturbation of syndapin/PACSIN impairs synaptic vesicle recycling evoked by intense stimulation. *J Neurosci*, 28(15):3925-3933.

Anggono V, Smillie KJ, Graham ME, Valova VA, Cousin MA, Robinson PJ. 2006. Syndapin I is the phosphorylation-regulated dynamin I partner in synaptic vesicle endocytosis. *Nat Neurosci*, 9(6):752-760.

Araya R, Jiang J, Eiselthal KB, Yuste R. 2006. The spine neck filters membrane potentials. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(47):17961-17966.

Aunis D, Bader MF. 1988. The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. *J Exp Biol*. 139:253-266.

Azoury J, Lee KW, Georget V, Rassinier P, Leader B, Verlhac MH. 2008. Spindle positioning in mouse oocytes relies on a dynamic meshwork of actin filaments. *Curr Biol*, 18(19):1514-1519.

Bailly M, Ichetovkin I, Grant W, Zebda N, Machesky LM, Segall JE, Condeelis J. 2001. The F-actin side binding activity of the Arp2/3 complex is essential for actin nucleation and lamellipod extension. *Curr Biol*, 11(8):620-625.

Banker GA, Cowan WM. 1977. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res*, 126(3):397-425.

Banker GA, Cowan WM. 1979. Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture. *J Comp Neurol*, 187(3):469-493.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.

Bramham CR. 2008. Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Curr Opin Neurobiol*, 18(5):524-531.

Braun A, Pinyol R, Dahlhaus R, Koch D, Fonarev P, Grant BD, Kessels MM, Qualmann B. 2005. EHD proteins associate with syndapin I and II and such interactions play a crucial role in endosomal recycling. *Mol Biol Cell*, 16(8), 3642-3658.

Cajal SR. 1888. Sobre las fibras nerviosas de la capa molecular del cerebelo. *Rev Trim Histol Norm Patol*, 2:33-41.

Carroll EA, Gerrelli D, Gasca S, Berg E, Beier DR, Copp AJ, Klingensmith J. 2003. Cordon-bleu is a conserved gene involved in neural tube formation. *Dev Biol*, 262(1):16-31.

Cesa R, Scelfo B, Strata P. 2007. Activity-dependent presynaptic and postsynaptic structural plasticity in the mature cerebellum. *J Neurosci*, 27(17):4603-4611.

Chereau D, Boczkowska M, Skwarek-Maruszewska A, Fujiwara I, Hayes DB, Rebowski G, Lappalainen P, Pollard TD, Dominguez R. 2008. Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells. *Science*, 320(5873):239-243.

Clayton EL, Anggono V, Smillie KJ, Chau N, Robinson PJ, Cousin MA. 2009. The phospho-dependent dynamin-syndapin interaction triggers activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurosci*, 29(24):7706-7717.

Conde C, Cáceres A. 2009. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci*, 10(5):319-332.

Conley CA, Fritz-Six KL, Almenar-Queralt A, Fowler VM. 2001. Leiomodins: Larger members of the tropomodulin (Tmod) gene family. *Genomics*, 73(2):127-139.

Connert S, Wienand S, Thiel C, Krikunova M, Glyvuk N, Tsytsyura Y, Hilfiker-Kleiner D, Batsch JW, Klingauf J, Wienands J. 2006. SH3P7/mAbp1 deficiency leads to tissue and behavioural abnormalities and impaired vesicle transport. *EMBO J*, 25(8):1611-1622.

Dahlgaard K, Raposo AA, Niccoli T, St Johnston D. 2007. Capu and Spire assemble a cytoplasmic actin mesh that maintains microtubule organization in the *Drosophila* oocyte. *Dev Cell*, 13(4):539-553.

Dailey ME, Smith SJ. 1996. The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci*, 16(9):2983-2994.

Dharmalingam E, Haeckel A, Pinyol R, Schwintzer L, Koch D, Kessels MM, Qualmann B. 2009. F-BAR proteins of the syndapin family shape the plasma membrane and are crucial for neuromorphogenesis. *J Neurosci*, 29(42):13315-13327.

Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, 8(4):1454-1468.

Drubin DG, Miller KG, Botstein D. 1988. Yeast actin-binding proteins: Evidence for a role in morphogenesis. *J Cell Biol*, 107(6 Pt 2):2551-2561.

Ethell IM, Pasquale EB. 2005. Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodelling. *Prog Neurobiol*, 75(3):161-205.

Fenster SD, Kessels MM, Qualmann B, Chung WJ, Nash J, Gundelfinger ED, Garner CC. 2003. Interactions between Piccolo and the actin/dynamin-binding protein Abp1 link vesicle endocytosis to presynaptic active zones. *J Biol Chem*, 278(22):20268-20277.

Fiala JC, Spacek J, Harris KM. 2002. Dendritic spine pathology: Cause or consequence of neurological disorders?. *Brain Res Brain Res Rev*, 39(1):29-54.

Fujimoto LM, Roth R, Heuser JE, Schmid SL. 2000. Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Traffic*, 1(2):161-171.

Garrels JI, Gibson W. 1976. Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell*, 9(4 Pt 2):793-805.

Gasca S, Hill DP, Klingensmith J, Rossant J. 1995. Characterization of a gene trap insertion into a novel gene, *cordon-bleu*, expressed in axial structures of the gastrulating embryo. *Dev Genet*, 17(2):141-154.

Giner D, Neco P, Francés Mdel M, Lopéz I, Viniegra S, Gutiérrez LM. 2005. Real-time dynamics of the F-actin cytoskeleton during secretion from chromaffin cells. *J Cell Sci*, 118(13):2871-2880.

Goley ED, Welch MD. 2006. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(10):713-726.

Goode BL, Eck MJ. 2007. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem*, 76:596-627.

Gu J, Firestein BL, Zheng JQ. 2008. Microtubules in dendritic spine development. *J Neurosci*, 28(46):12120-12124.

Guillausseau PJ, Meas T, Virally M, Laloi-Michelin M, Médeau V, Kevorkian JP. 2008. Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab*, 34 Suppl 2:S43-48.

Haeckel A, Ahuja R, Gundelfinger ED, Qualmann B, Kessels MM. 2008. The actin-binding protein Abp1 controls dendritic spine morphology and is important for spine head and synapse formation. *J Neurosci*, 28(40):10031-10044.

Halbach A, Mörgelin M, Baumgarten M, Milbrandt M, Paulsson M, Plomann M. 2007. PACSIN 1 forms tetramers via its N-terminal F-BAR-domain. *FEBS J*, 274(3):773-782.

Han J, Shui JW, Zhang X, Zheng B, Han S, Tan TH. 2005. HIP-55 is important for T-cell proliferation, cytokine production, and immune responses. *Mol Cell Biol*, 25(16):6869-6878.

Hering H, Sheng M. 2001. Dendritic spines: Structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci*, 2(12):880-888.

Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature*, 347(6288):44-49.

Honkura N, Matsuzaki M, Noguchi J, Ellis-Davies GC, Kasai H. 2008. The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron*, 57(5):719-729.

Hotulainen P, Llano O, Smirnov S, Tanhuanpää K, Faix J, Rivera C, Lappalainen P. 2009. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol*, 185(2):323-339.

Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF, Holmes KC. 1990. Atomic structure of the actin:DNAse I complex. *Nature*, 347(6288):37-44.

Kessels MM, Dong J, Leibig W, Westermann P, Qualmann B. 2006. Complexes of syndapin II and dynamin II promote vesicle formation at the trans-Golgi network. *J Cell Sci*, 119(Pt 8):1504-1516.

Kessels MM, Engqvist-Goldstein AE, Drubin DG. 2000. Association of mouse actin-binding protein 1 (mAbp1/SH3P7), an Src kinase target, with dynamic regions of the cortical actin cytoskeleton in response to Rac1 activation. *Mol Biol Cell*, 11(1):393-412.

Kessels MM, Engqvist-Goldstein AE, Drubin DG, Qualmann B. 2001. Mammalian Abp1, a signal-responsive F-actin-binding protein, links the actin cytoskeleton to endocytosis via the GTPase dynamin. *J Cell Biol*, 153(2):351-366.

Kessels MM, Qualmann B. 2002. Syndapins integrate N-WASP in receptor-mediated endocytosis. *EMBO J*, 21(22):6083-6094.

Kessels MM, Qualmann B. 2006. Syndapin oligomers interconnect the machineries for endocytic vesicle formation and actin polymerization. *J Biol Chem*, 281(19):13285-13299.

- Kessels MM, Schwintzer L, Schlobinski D, Qualmann B. 2010. Controlling actin cytoskeletal organization and dynamics during neuronal morphogenesis. *Eur J Cell Biol*, [*Epub ahead of print*].
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. 2003. Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol Biol Cell*, 14(11):4628-4640.
- Knott G, Holtmaat A. 2008. Dendritic spine plasticity – current understanding from in vivo studies. *Brain Res Rev*, 58(2):282-289.
- Kunda P, Baum B. 2009. The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning. *Trends Cell Biol*, 19(4):174-179.
- Kuriu T, Inoue A, Bito H, Sobue K, Okabe S. 2006. Differential control of postsynaptic density scaffolds via actin-dependent and -independent mechanisms. *J Neurosci*, 26(29):7693-7706.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680-685.
- Lambrechts A, Gevaert K, Cossart P, Vandekerckhove J, Van Troys M. 2008. *Listeria* comet tails: The actin-based motility machinery at work. *Trends Cell Biol*, 18(5):220-227.
- Landis DM, Reese TS. 1983. Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines. *J Cell Biol*, 97(4):1169-1178.
- Lane NJ. 1969. Intranuclear fibrillar bodies in actinomycin D-treated oocytes. *J Cell Biol*, 40(1):286-291.
- Larbolette O, Wollscheid B, Schweikert J, Nielsen PJ, Wienands J. 1999. SH3P7 is a cytoskeleton adapter protein and is coupled to signal transduction from lymphocyte antigen receptors. *Mol Cell Bio*, 19(2):1539-154.

Lariviere RC, Julien JP. 2003. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol*, 58(1):131-148.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell JE. 2004. *Molecular Cell Biology*. 5th Edition. New York, USA: W. H. Freeman, 779-805.

Lowery LA, Van Vactor D. 2009. The trip of the tip: Understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(5):332-343.

Luo L. 2002. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18:601-635.

Machesky LM, Insall RH. 1998. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*, 8(25):1347-1356.

Madsen OD, Jensen J, Blume N, Petersen HV, Lund K, Karlsen C, Andersen FG, Jensen PB, Larsson LI, Serup P. 1996. Pancreatic development and maturation of the islet B cell. Studies of pluripotent islet cultures. *Eur J Biochem*, 242(3):435-445.

Malacombe M, Bader MF, Gasman S. 2006. Exocytosis in neuroendocrine cells: New tasks for actin. *Biochim Biophys Acta*, 1763(11):1175-1183.

Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Van Obberghen E, Somers G, Devis G, Ravazzola M, Orci L. 1975. Role of microtubules in the phasic pattern of insulin release. *Ann N Y Acad Sci*, 253:630-652.

Mattila PK, Lappalainen P. 2008. Filopodia: Molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(6):466-454.

Matus A. 2000. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science*, 290(5492):754-758.

- Matus A, Ackermann M, Pehling G, Byers HR, Fujiwara K. 1982. High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79(23):7590-7594.
- Merrifield CJ, Feldman ME, Wan L, Almers W. 2002. Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat Cell Biol*, 4(9):691-698.
- Merrifield CJ, Moss SE, Ballestrem C, Imhof BA, Giese G, Wunderlich I, Almers W. 1999. Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat Cell Biol*, 1(1):72-74.
- Millard TH, Sharp SJ, Machesky LM. 2004. Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J*, 380(Pt 1):1-17.
- Miller M, Peters A. 1981. Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *J Comp Neurol*, 203(4):555-573.
- Mise-Omata S, Montagne B, Deckert M, Wienands J, Acuto O. 2003. Mammalian actin binding protein 1 is essential for endocytosis but not lamellipodia formation: Functional analysis by RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun*, 301(3):704-710.
- Modregger J, Ritter B, Witter B, Paulsson M, Plomann M. 2000. All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *J Cell Sci*, 113(24):4511-4521.
- Newpher TM, Ehlers MD. 2008. Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains. *Neuron*, 58(4):472-497.
- Okabe S. 2007. Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Mol Cell Neurosci*, 34(4):503-518.
- Onabajo OO, Seeley MK, Kale A, Qualmann B, Kessels MM, Han J, Tan TH, Song W. 2008. Actin-binding protein 1 regulates B cell receptor-mediated antigen processing and presentation in response to B cell receptor activation. *J Immunol*, 180(10):6685-6695.

- Orci L, Gabbay KH, Malaisse WJ. 1972. Pancreatic beta-cell web: Its possible role in insulin secretion. *Science*, 175(26):1128-1130.
- Orci L, Malaisse-Lagae F, Ravazzola M, Amherdt M, Renold AE. 1973. Exocytosis-endocytosis coupling in the pancreatic beta cell. *Science*, 181(99):561-562.
- Pellegrin S, Mellor H. 2005. The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr Biol*, 15(2):129-133.
- Pellegrin S, Mellor H. 2007. Actin stress fibres. *J Cell Sci*, 120(20):3491-3499.
- Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJ, Evans PR, McMahon HT. 2004. BAR domains as sensors of membrane curvature: The amphiphysin BAR structure. *Science*, 303(5657):495-499.
- Peters A, Kaiserman-Abramof IR. 1969. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The synapses upon dendritic spines. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 100(4):487-506.
- Pinyol R, Haeckel A, Ritter A, Qualmann B, Kessels MM. 2007. Regulation of N-WASP and the Arp2/3 complex by Abp1 controls neuronal morphology. *PloS One*, 2(5):e400.
- Plomann M, Lange R, Vopper G, Cremer H, Heinlein UA, Scheff S, Baldwin SA, Leitges M, Cramer M, Paulsson M, Barthels D. 1998. PACSIN, a brain protein that is upregulated upon differentiation into neuronal cells. *Eur J Biochem*, 256(1):201-211.
- Pollard TD. 2010. Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol*, 22(1):50-56.
- Pollard TD, Beltzner CC. 2002. Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol*, 12(6):768-774.
- Praefcke GJ, McMahon HT. 2004. The dynamin superfamily: Universal membrane tubulation and fission molecules?. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(2):133-147.

- Pruyne D, Evangelista M, Yang C, Bi E, Zigmond S, Bretscher A, Boone C. 2002. Role of formins in actin assembly: Nucleation and barbed-end association. *Science*, 297(5581):612-615.
- Qualmann B, Boeckers TM, Jeromin M, Gundelfinger ED, Kessels MM. 2004. Linkage of the actin cytoskeleton to the postsynaptic density via direct interactions of Abp1 with the ProSAP/Shank family. *J Neurosci*, 24(10):2481-2495.
- Qualmann B, Kessels MM, Kelly RB. 2000. Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*, 150(5):F111-116.
- Qualmann B, Roos J, DiGregorio PJ, Kelly RB. 1999. Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Mol Biol Cell*, 10(2):501-513.
- Quinlan ME, Heuser JE, Kerkhoff E, Mullins RD. 2005. *Drosophila* Spire is an actin nucleation factor. *Nature*, 433(7024):328-388.
- Quinlan ME, Hilgert S, Bedrossian A, Mullins RD, Kerkhoff E. 2007. Regulatory interactions between two actin nucleators, Spire and Cappucino. *J Cell Biol*, 179(1):117-128.
- Rácz B, Weinberg RJ. 2008. Organization of the Arp2/3 complex in hippocampal spines. *J Neurosci*, 28(22):5654-5659.
- Ritter B, Modregger J, Paulsson M, Plomann M. 1999. PACSIN 2, a novel member of the PACSIN family of cytoplasmic adapter proteins. *FEBS Lett*, 454(3):356-362.
- Robinson TE, Kolb B. 1999. Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur J Neurosci*, 11(5):1598-1604.
- Rosales-Nieves AE, Johndrow JE, Keller LC, Magie CR, Pinto-Santini DM, Parkhurst SM. 2006. Coordination of microtubule and microfilament dynamics by *Drosophila* Rho1, Spire and Cappucino. *Nat Cell Biol*, 8(4):367-376.

Rozelle AL, Machesky LM, Yamamoto M, Driessens MH, Insall RH, Roth MG, Luby-Phelps K, Marriott G, Hall A, Yin HL. 2000. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol*, 10(6):311-320.

Sabatini BL, Maravall M, Svoboda K. 2001. Ca(2+) signaling in dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol*, 11(3):349-356.

Sagot I, Rodal AA, Moseley J, Goode BL, Pellman D. 2002. An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol*, 4(8):626-631.

Schumacher N, Borawski JM, Leberfinger CB, Gessler M, Kerkhoff E. 2004. Overlapping expression pattern of the actin organizers Spir-1 and formin-2 in the developing mouse nervous system and the adult brain. *Gene Expr Patterns*, 4(3):249-255.

Sekino Y, Kojima N, Shirao T. 2007. Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochem Int*, 51(2-4):92-104.

Shepherd GM. 1996. The dendritic spine : A multifunctional integrative unit. *J Neurophysiol*, 75(6):2197-2210.

Shimada A, Niwa H, Tsujita K, Suetsugu S, Nitta K, Hanawa-Suetsugu K, Akasaka R, Nishino Y, Toyama M, Chen L, Liu ZJ, Wang BC, Yamamoto M, Terada T, Miyazawa A, Tanaka A, Sugano S, Shirouzu M, Nagayama K, Takenawa T, Yokoyama S. 2007. Curved ECF/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis. *Cell*, 129(4):761-772.

Slepnev VI, De Camilli P. 2000. Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci*, 1(3):161-172.

Small JV, Auinger S, Nemethova M, Koestler S, Goldie KN, Hoenger A, Resch GP. 2008. Unravelling the structure of the lamellipodium. *J Microsc*, 231(3):479-485.

Sorra KE, Harris KM. 2000. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, 10(5):501-511.

- Sotelo C. 1990. Cerebellar synaptogenesis: What we can learn from mutant mice. *J Exp Biol*, 153:225-249.
- Sotelo C, Dusart I. 2009. Intrinsic versus extrinsic determinants during the development of Purkinje cell dendrites. *Neuroscience*, 162(3):589-600.
- Star EN, Kwiatkowski DJ, Murthy VN. 2002. Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci*, 5(3):239-246.
- Straub FB, Feuer G. 1950. Adenosine triphosphate, the functional group of actin. *Biochim Biophys Acta*, 4:455-470.
- Sumoy L, Pluvinet R, Andreu N, Estivill X, Escarceller M. 2001. PACSIN 3 is a novel SH3 domain cytoplasmic adapter protein of the pacsin-syndapin-FAP52 gene family. *Gene*, 262(1-2):199-205.
- Tanaka M. 2009. Dendrite formation of cerebellar purkinje cells. *Neurochem Res*, 34(12):2078-2088.
- Tsay D, Yuste R. 2004. On the electrical function of dendritic spines. *Trends Neurosci*, 27(2):77-83.
- Van Troys M, Dewitte D, Goethals M, Carlier MF, Vandekerckhove J, Ampe C. 1996. The actin binding site of thymosin beta 4 mapped by mutational analysis. *EMBO J*, 15(2):201-210.
- Vartiainen MK. 2008. Nuclear actin dynamics – from form to function. *FEBS Lett*, 582(14):2033-2040.
- Vavylonis D, Kovar DR, O'Shaughnessy B, Pollard TD. 2006. Model of formin-associated actin filament elongation. *Mol Cell*, 21(4):455-466.
- Von Dassow G. 2009. Concurrent cues for cytokinetic furrow induction in animal cells. *Trends Cell Biol*, 19(4):165-173.

Wang Q, Navarro MV, Peng G, Molinelli E, Goh SL, Judson BL, Rajashankar KR, Sondermann H. 2009. Molecular mechanism of membrane constriction and tubulation mediated by the F-BAR protein Pacsin/Syndapin. *Proc Natl Sci USA*, 106(31):12700-12705.

Wang Z, Thurmond DC. 2009. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis – roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci*, 122(7):893-903.

Wegner AM, Nebhan CA, Hu L, Majumdar D, Meier KM, Weaver AM, Webb DJ. 2008. *J Biol Chem*, 283(23):15912-15920.

Xiao X und Yang WX. 2007. Actin-based dynamics during spermatogenesis and its significance. *J Zhejiang Univ Sci B*, 8(7):498-506.

Xu Y, Moseley JB, Sagot I, Poy F, Pellman D, Goode BL, Eck MJ. 2004. Crystal structure of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimmer architecture. *Cell*, 116(5):711-723.

Yarar D, Waterman-Storer CM, Schmid SL. 2005. A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell*, 16(2):964-975.

Yuste R, Bonhoeffer T. 2001. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 24:1071-1089.

Yuste R, Majewska A, Holthoff K. 2000. From form to function: Calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nat Neurosci*, 3(7):653-659.

Zhang W, Khan A, Ostenson CG, Berggren PO, Efendic S, Meister B. 2002. Down-regulated expression of exocytotic proteins in pancreatic islets of diabetic GK rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 291(4):1038-1044.

Zheng B, Han M, Bernier M, Wen JK. 2009. Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *FEBS J*, 276(10):2669-2685.

Ziv NE, Smith SJ. 1996. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*, 17(1):91-102.

Dissertationen, Masterarbeiten:

Ahuja R. 2007. Cordon bleu, an interaction partner of Syndapins and Abp1, is a novel actin nucleator which modulates neuronal morphology [Dissertation]. Magdeburg: Otto-von Guericke-Universität.

Dharmalingam E. 2009. Coordination of membrane-cytoskeleton interactions – role of syndapins and Abp1 [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

Koch D. 2009. Charakterisierung einer *knockout* Maus des F-BAR-Domänen-enthaltenden, endocytotischen Proteins Syndapin I [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

Schwintzer L. 2008. Analyse der molekularen Mechanismen und zellbiologischen Funktionen des auf WH2-Domänen basierenden Aktin-Nukleationsfaktors Cordon-bleu [Masterarbeit]. Lübeck: Universität zu Lübeck.

11 ANHANG

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Die drei Schritte der *in vitro*-Polymerisation von G-Aktin
- Abb. 2 Verschiedene Mechanismen der Aktinnukleation
- Abb. 3 Der neue Aktin-nukleierende Faktor Cobl
- Abb. 4 Domänen-Organisation von Abp1
- Abb. 5 Domänen-Organisation der Syndapin-Proteinfamilie
- Abb. 6 Morphogenese und *spine*-Ausbildung primärer hippocampaler Neuronen in Kultur
- Abb. 7 Morphologische Analyse der dendritischen *spines*
- Abb. 8 Cobl-Varianten durch alternatives Spleißen und Epitope der anti-Cobl-Antikörper
- Abb. 9 SDS-PAGE-Analyse der Proteinaufreinigung von GST-Cobl 175-324 mittels Coomassie Brilliant Blau-Färbung
- Abb. 10 Western Blot-Analyse von affinitätsgereinigten anti-Cobl-Antikörpern
- Abb. 11 Charakterisierung von affinitätsgereinigten anti-Cobl^{ARA} rb-Antikörpern in Immunfluoreszenzanalysen
- Abb. 12 Charakterisierung von affinitätsgereinigten anti-Cobl^{ARA} gp-Antikörpern in Immunfluoreszenzanalysen
- Abb. 13 Charakterisierung von affinitätsgereinigten anti-Cobl^{DBY} rb-Antikörpern in Immunfluoreszenzanalysen
- Abb. 14 Western Blot-Analyse von affinitätsgereinigten anti-His₆-TRX-Antikörpern
- Abb. 15 Immunhistochemische Analyse der Cobl-Expression im cerebralen Cortex
- Abb. 16 Immunocytochemische Detektion von Cobl in primären corticalen Neuronen
- Abb. 17 Immunhistochemische Analyse der Cobl-Expression im Hippocampus
- Abb. 18 Immunhistochemische Analyse der nukleären Cobl-Lokalisation
- Abb. 19 Darstellung der Cobl-Expression in primären hippocampalen Neuronen
- Abb. 20 Analyse der synaptischen Lokalisation von Cobl in primären hippocampalen Neuronen
- Abb. 21 Morphologische Analysen zur *spine*-Länge nach RNAi-vermitteltem Cobl-*knockdown*
- Abb. 22 Bestimmung der *spine*-Dichte nach RNAi-vermitteltem Cobl-*knockdown*

Abb. 23	Relative Anteile der morphologischen <i>spine</i> -Klassen nach RNAi-vermitteltem <i>Cobl-knockdown</i>
Abb. 24	Morphologische Analysen zur <i>spine</i> -Länge nach Überexpression von EGFP- <i>Cobl</i> -Konstrukten
Abb. 25	Bestimmung der <i>spine</i> -Dichte nach Überexpression von EGFP- <i>Cobl</i> -Konstrukten
Abb. 26	Relative Anteile der zu einer morphologischen Klasse gehörenden <i>spines</i> nach Überexpression verschiedener EGFP- <i>Cobl</i> -Konstrukte
Abb. 27	Immunhistochemische Analyse der <i>Cobl</i> -Expression im Kleinhirn
Abb. 28	Transfizierte Purkinje-Zelle einer cerebellären Schnittkultur
Abb. 29	Morphologische Analyse der Dendritenbäume von cerebellären Purkinje-Zellen nach RNAi-vermitteltem <i>Cobl-knockdown</i>
Abb. 30	Immunhistochemische Detektion der Expression von <i>Cobl</i> im Hoden
Abb. 31	Immunhistochemische Analyse der <i>Cobl</i> -Expression in der Milz
Abb. 32	Immunhistochemische Analyse der <i>Cobl</i> -Expression im Pankreas
Abb. 33	Kolokalisationsanalyse von <i>Cobl</i> und <i>Abp1</i> im Hippocampus nach immunhistochemischer Färbung von Gehirnschnitten
Abb. 34	Kolokalisationsanalyse von <i>Cobl</i> und Syndapin I im Hippocampus nach immunhistochemischer Färbung von Gehirnschnitten
Abb. 35	Kolokalisationsstudien zur endogenen Lokalisation von <i>Cobl</i> und <i>Abp1</i> (A-D) bzw. <i>Cobl</i> und Syndapin I (E-H) im Kleinhirn
Abb. 36	Immunhistochemische Kolokalisationsuntersuchung zur Expression von <i>Cobl</i> und <i>Abp1</i> im Hoden
Abb. 37	Immunhistochemische Untersuchung zur Kolokalisation von <i>Cobl</i> und <i>Abp1</i> in der Milz
Abb. 38	Immunhistochemische Kolokalisationsanalyse von <i>Cobl</i> und seinen Interaktionspartnern <i>Abp1</i> bzw. Syndapin I im Pankreas
Abb. 39	Modell zur Aktindynamik während der Ausbildung dendritischer <i>spines</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme
Tabelle 2	Hintergrund der Wildtyp- und <i>knockout</i> -Mäuse für Abp1 und Syndapin I
Tabelle 3	Verwendete primäre Antikörper
Tabelle 4	Verwendete sekundäre Antikörper
Tabelle 5	Verwendete Oligodesoxyribonucleotide (<i>Primer</i>)
Tabelle 6	Verwendete Plasmidvektoren
Tabelle 7	Verwendete cDNA-Expressionskonstrukte
Tabelle 8	Genotypisierung von Abp1 (+/+)- und Abp1 (-/-)-Mäusen
Tabelle 9	Genotypisierung von Syndapin I (+/+)- und Syndapin I (-/-)-Mäusen
Tabelle 10	Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels
Tabelle 11	Affinitätsgereinigte anti-Cobl-Antikörper, deren Antigene sowie die zur Aufreinigung verwendeten Fusionsproteine
Tabelle 12	Affinitätsgereinigte anti-His ₆ -TRX-Antikörper, deren Antigene sowie die zur Aufreinigung verwendeten Fusionsproteine

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2008 bis Dezember 2010 unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Britta Qualmann am Institut für Biochemie I des Universitätsklinikums Jena angefertigt. Ich möchte mich herzlich bei all jenen bedanken, die mich während dieser Zeit begleitet und so zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein tiefer Dank gilt Frau Prof. Dr. Britta Qualmann sowie Herrn PD Dr. Michael Kessels, die mir die Bearbeitung dieses vielseitigen Projektes ermöglichten, mich dabei in jeder Phase unterstützten und vor allem ermutigten, ganz neue Wege einzuschlagen.

Danken möchte ich auch dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena sowie dem Förderkreis Neurowissenschaften "Hans Berger" e. V., durch deren finanzielle Unterstützung ich in der Lage war, mich auf das intensive Projekt zu konzentrieren.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Antje Hübner sowie Anne Sinning (Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Universitätsklinikum Jena), die mir die Technik der Immunhistochemie vermittelten, und damit einen großen Teil meines Projektes überhaupt erst ermöglichten. Im gleichen Atemzug möchte ich Frau Dr. Heike Heuer herzlich danken. Sie und ihre Arbeitsgruppe am Leibniz-Institut für Altersforschung - Fritz-Lipmann-Institut e.V. in Jena führten mich in die Anfertigung und *Gene Gun*-Transfektion organotypischer Kleinhirnschnittkulturen ein.

Die gesamte Arbeitsgruppe am Institut für Biochemie I ermöglichte mir in den vergangenen zwei Jahren eine intensive, sowohl wissenschaftliche als auch persönliche Weiterentwicklung. Mein besonderer Dank gilt Lukas Schwintzer, der mich geduldig in die Laborarbeit einführte, sowie Dr. Nicole Koch, Dr. Dennis Koch, Dirk Schlobinski und Dr. Natja Haag für ihre praktische Hinweise und offenen Ohren. Ich möchte Birgit Schade, Waltraud Seul und ganz besonders Annett Kreusch für die engagierte technische Unterstützung danken. Für die freundschaftliche Zusammenarbeit und vor allem auch die gemeinsamen Erlebnisse außerhalb des Labors danke ich weiterhin Katharina Schneider, Christina Witte, Dr. Susann Schüler und Dr. Klaus Schilling. Ganz besonders möchte ich Sabine Nemitz, die mir zu einer lieben Freundin geworden ist, für all ihre Bemühungen und unterstützenden Worte danken.

Von ganzem Herzen danke ich meiner lieben Familie, die mich in jeder Sekunde bei der Verwirklichung meiner Ziele unterstützt. Danke.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich die in der Danksagung erwähnten Personen während der Anfertigung der Dissertationsarbeit unterstützt haben,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift des Verfassers